

**Mechanismus der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Wirkung  
 $\beta$ -zytotroper Nährstoffe und Interaktion neuer  
Sulfonylharnstoff-Analoga mit  $K_{ATP}$ -Kanälen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von  
**Katja Hastedt**  
aus  
**Zeven**

1. Referent: Prof. Dr. med. U. Panten  
2. Referent: Prof. Dr. med. S. Lenzen  
eingereicht am: 15. 08. 2002  
mündliche Prüfung am: 25. 11. 2002  
Druckjahr: 2002

## Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Tagungsbeiträge:

HASTEDT K, PANTEN U: Nährstoff-induzierte Insulinsekretion, die nicht durch ATP-empfindliche  $K^+$ -Kanäle vermittelt wird. 7. Inselworkshop der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Münster, Dezember 2001.

HASTEDT K, PANTEN U: Fuel-induced insulin secretion not mediated by ATP-sensitive  $K^+$ -channels. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 110 (Suppl. 1): S34, p034. 46. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Göttingen, Februar-März 2002.

HASTEDT K, SCHMELING H, ZÜNKLER BJ, PANTEN U: Mechanism of insulin-releasing action of  $\alpha$ -ketomonocarboxylic acids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl. 1): R71, 269. 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März 2002.

HASTEDT K, PANTEN U: Strong insulin-releasing effect of  $\alpha$ -ketoisocaproic acid not mediated by ATP-sensitive  $K^+$ -channels. *Diabetes und Stoffwechsel* 11 (Suppl. 1): 60, 3-3. 37. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Dresden, Mai 2002.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1999 bis August 2002 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig angefertigt.

Herrn Prof. Dr. med. U. Panten danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung und für die stets freundliche und hilfreiche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau G. Wittenberg (Bindungsexperimente und Insulinsekretion), Frau I. Thomsen (Patch-Clamp-Experimente) sowie Frau H. Fürstenberg, Frau B. Pieper, Frau C. Rattunde (Zellkultur, Transfektion) und Frau H. Arend, Frau C. Schulze (Tierhaltung) für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Allen meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie danke ich sehr für den Spaß (!) bei der Arbeit.

## INHALT

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>01</b>
<b>1.1</b>	<b>Diabetes mellitus</b>	<b>01</b>
1.1.1	Definition und Einteilung	01
1.1.2	Ursachen und Pathogenese des Typ 2-Diabetes	02
1.1.3	Therapie des Typ 2-Diabetes	04
<b>1.2</b>	<b>Insulinsekretion durch pankreatische B-Zellen</b>	<b>05</b>
<b>1.3</b>	<b>K<sub>ATP</sub>-Kanäle</b>	<b>07</b>
1.3.1	Funktion und Kontrolle des K <sub>ATP</sub> -Kanals der B-Zelle	07
1.3.2	Struktur von K <sub>ATP</sub> -Kanälen	08
1.3.3	Weitere Ionenkanäle der B-Zelle	09
<b>1.4</b>	<b>Sulfonylharnstoff-Rezeptoren</b>	<b>10</b>
1.4.1	Nachweis in Geweben und Aufbau	10
1.4.2	Subtypen von Sulfonylharnstoff-Rezeptoren	11
1.4.3	Lokalisation der Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe	12
1.4.4	Affinität von Sulfonylharnstoffen und Analoga zu SUR-Subtypen	12
<b>1.5</b>	<b>K<sub>ATP</sub>-Kanal-unabhängige Insulinsekretion</b>	<b>14</b>
1.5.1	Entdeckung und Charakterisierung	14
1.5.2	Produkte des Energiestoffwechsels als Vermittler des K <sub>ATP</sub> -Kanal-unabhängigen Effektes	14
1.5.3	Glutamat als Vermittler des K <sub>ATP</sub> -Kanal-unabhängigen Effektes	15
<b>1.6</b>	<b>Insulinsekretion durch <math>\alpha</math>-Ketomonocarbonsäuren und BCH</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Mechanismus der durch <math>\beta</math>-zytrotrope Nährstoffe induzierten K<sub>ATP</sub>-Kanal-unabhängigen Insulinsekretion</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Strukturelle Voraussetzungen für die Interaktion von Sulfonylharnstoffen und Analoga mit K<sub>ATP</sub>-Kanälen</b>	<b>19</b>

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Perifusion isolierter Maus-Pankreasinseln</b>	<b>23</b>
3.1.1	Basismedium für die Inselisolierung und die Perifusion	23
3.1.2	Lösungen der Testsubstanzen	24
3.1.2.1	Glipizid-Stammlösung (0,54 mM)	24
3.1.2.2	Kontrollmedien	24
3.1.2.3	Testmedien	25
3.1.3	Versuchstiere	26
3.1.4	Inselisolierung	26
3.1.4.1	Medium für die Inselisolierung	26
3.1.4.2	Durchführung der Inselisolierung	26
3.1.5	Durchführung der Perifusion	27
3.1.6	Reinigung des Perifusionssystems	28
3.1.7	Bestimmung des Insulingehaltes	29
3.1.8	Datenauswertung	29
<b>3.2</b>	<b>Synthesen</b>	<b>30</b>
3.2.1	5-Chlor-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-2-methoxybenzamid	30
3.2.2	{4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat	31
3.2.3	Verwendete Geräte	32
<b>3.3</b>	<b>Zellkultur und Transfektion von COS1-Zellen sowie Membranpräparation</b>	<b>33</b>
3.3.1	Kultivierung, Passagierung und Kryokonservierung von COS1-Zellen	33
3.3.1.1	Lösungen und Medien für die Zellkultur	33
3.3.1.2	Kultivierung von COS1-Zellen	34
3.3.1.3	Umsetzen der Zellen (Passagieren)	34
3.3.1.4	Kryokonservierung von COS1-Zellen	34
3.3.2	Transformation und Plasmidpräparation	35
3.3.2.1	Lösungen für die Transformation und Plasmidpräparation	35
3.3.2.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	37
3.3.2.3	Durchführung der Transformation	38
3.3.2.4	Plasmidpräparation	38
3.3.3	Transfektion	39
3.3.3.1	Lösungen	39
3.3.3.2	Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode	41
3.3.3.3	Histologische Lac Z-Färbung	41

3.3.4	Membranpräparation	43
3.3.4.1	Lösungen für die Membranpräparation	43
3.3.4.2	Präparation von Membranen aus COS1-Zellen	44
3.3.5	Proteinbestimmung	45
3.3.5.1	Lösungen für die Proteinbestimmung	45
3.3.5.2	Durchführung der Proteinbestimmung	45
<b>3.4</b>	<b>Bindungsexperimente an Membranen von COS1-Zellen</b>	45
3.4.1	Lösungen für die Bindungsexperimente	45
3.4.2	Stammlösungen der eingesetzten Testsubstanzen	47
3.4.3	Vorbereitung der Membranen	49
3.4.4	Gleichgewichts-Bindungsexperimente	49
3.4.4.1	Prinzip des Filtrationsassays	49
3.4.4.2	Inkubationen	49
3.4.5	Filtration und Szintillationszählung	50
<b>3.5</b>	<b>Elektrophysiologische Registrierung</b>	51
3.5.1	Basislösungen	51
3.5.2	Lösungen der eingesetzten Nukleotide	51
3.5.3	Stammlösungen der eingesetzten Testsubstanzen	51
3.5.4	Patch-Clamp-Technik in der Inside-out-Konfiguration	52
3.5.5	Versuchsablauf	53
3.5.6	Auswertung	53
<b>3.6</b>	<b>Datenauswertung von Bindungs- und Patch-Clamp-Experimenten</b>	54
3.6.1	Statistik	54
3.6.2	Konzentrations-Bindungs- und Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen	54
3.6.3	Dissoziationskonstanten	54
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	55
<b>4.1</b>	<b>Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln</b>	55
4.1.1	Steigerung der Insulinsekretion durch Glucose	55
4.1.2	Steigerung der Insulinsekretion durch $\alpha$ -Ketoisocapronat (KIC)	59
4.1.3	Steigerung der Insulinsekretion durch $\alpha$ -Ketocapronat (KC)	64
4.1.4	Steigerung der Insulinsekretion durch $\alpha$ -Ketoisovalerat (KIV)	64
4.1.5	Steigerung der Insulinsekretion durch $\beta$ -Phenylpyruvat (PP)	66

4.1.6	Steigerung der Insulinsekretion durch (-)-b-BCH	68
4.1.7	Steigerung der Insulinsekretion durch Monomethylsuccinat (MMS)	69
<b>4.2</b>	<b>Interaktion von Sulfonylharnstoffen und Analoga mit <math>K_{ATP}</math>-Kanälen bzw. SUR-Subtypen</b>	<b>70</b>
4.2.1	Sulfonylharnstoff-Analogon mit einer Phosphatgruppe als anionischer Funktion	70
4.2.2	Repaglinid und Analoga	74
4.2.3	Sulfonylharnstoff-Derivate mit meta-ständiger Methyl(thio)harnstoff-Gruppe	79
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>84</b>
<b>5.1</b>	<b><math>K_{ATP}</math>-Kanal-unabhängige Insulinsekretion durch <math>\beta</math>-zytotrope Nährstoffe</b>	<b>84</b>
5.1.1	Blockade der $K_{ATP}$ -Kanäle der B-Zellen durch Glipizid	84
5.1.2	$K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion bei Perifusion mit Glipizid	84
5.1.3	$K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion bei Perifusion mit Glipizid und 10 mM Glucose	91
5.1.4	Kataplerose, die nicht der Energiegewinnung dient, und $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängiger Effekt	96
5.1.5	Angriffspunkte für ATP, die den $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effekt vermitteln könnten	98
<b>5.2</b>	<b>Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Interaktion von Sulfonylharnstoffen und Analoga mit SUR-Subtypen</b>	<b>98</b>
5.2.1	Phosphatgruppe als anionische Funktion eines Sulfonylharnstoff-Analogons	98
5.2.2	SUR-Affinität von Repaglinid und Analoga sowie deren Stereoisomeren	100
5.2.3	SUR2-Selektivität von Sulfonylharnstoff-Derivaten mit meta-ständiger Methyl(thio)harnstoff-Gruppe	104
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b>	<b>124</b>



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Diabetes mellitus

### 1.1.1 Definition und Einteilung

Diabetes mellitus resultiert aus einem Defekt der Sekretion und/oder Wirkung des Insulins, der zu pathologisch erhöhten Glucosekonzentrationen im Plasma führt. Nach Definition der American Diabetes Association (ADA) liegt ein Diabetes mellitus vor, wenn die Glucosekonzentration im Plasma nüchtern  $\geq 126$  mg/100 ml (7,0 mmol/l) oder 2 Stunden nach oraler Belastung mit 75 g Glucose  $\geq 200$  mg/100 ml (11,1 mmol/l) ist. Aufgrund der vielfältigen Wirkungen des Insulins im Kohlenhydrat-, Lipid-, Protein- und Elektrolytstoffwechsel kann es bei dieser Erkrankung zu lebensbedrohlichen akuten (ketoazidotisches und hyperosmolares Koma) und späten (Mikro- und Makroangiopathie) Komplikationen kommen, so dass Diabetiker neben einer Beeinträchtigung der Lebensqualität auch eine im Mittel um 5 Jahre verkürzte Lebenserwartung im Vergleich zu Nicht-Diabetikern aufweisen (JANKA et al., 2000). Mit einer Häufigkeit von 40 % ist der Herzinfarkt die an erster Stelle stehende Todesursache (GEISS et al., 1995) bei Diabetikern. Weltweit ist eine Zunahme der Prävalenz für Diabetes zu beobachten. In Deutschland sind 5 % der Bevölkerung von der Erkrankung betroffen (Dunkelziffer nicht berücksichtigt), es ist mit einer Zunahme der Erkrankungshäufigkeit auf 10 % im Jahre 2030 zu rechnen (HARRIS et al., 1998).

Gemäß der seit 1997 geltenden Nomenklatur der ADA wird Diabetes mellitus in 4 Kategorien eingeteilt. Ein Diabetes vom Typ 1 (früher: insulinabhängiger Diabetes, „Jugenddiabetes“) ist durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet, hervorgerufen durch eine autoimmune Zerstörung der pankreatischen B-Zellen. Hierfür existiert eine genetische Veranlagung, denn 5-10 % der Kinder oder Geschwister von Typ 1-Diabetikern in Europa erkranken ebenfalls an Typ 1-Diabetes (die Häufigkeit bei Personen mit stoffwechselgesunden Verwandten ersten Grades liegt bei 0,4 %; PFEIFFER, 2001). Diese Form des Diabetes beginnt meist in der Jugend oder im frühen Erwachsenenalter. Typ 1-Diabetiker machen nur 5-10 % aller Diabetiker aus.

Über 90 % der Diabetiker in den westlichen Industrienationen sind Typ 2-Diabetiker (früher: nicht insulinabhängiger Diabetes, „Altersdiabetes“). Diese Form der Erkrankung beginnt meist nach dem 40. Lebensjahr, allerdings tritt Typ 2-Diabetes aufgrund geänderter Lebensgewohnheiten zunehmend auch schon in jüngeren Lebensjahren auf. Prädisponierend für die Entwicklung eines Typ 2-Diabetes wirken Übergewicht (80 % der Erkrankten sind adipös) sowie bestimmte komplexe polygenetische Konstellationen. Die genetische Veranlagung spielt beim Typ 2-Diabetes eine größere Rolle als beim Typ 1, denn 20-40 % der Kinder oder

Geschwister von Typ 2-Diabetikern erkranken ebenfalls (BENNET, 1990). Kennzeichnend für Typ 2-Diabetes ist eine Insulinresistenz, die nicht mehr durch vermehrte Insulinsekretion kompensiert wird (relativer Insulinmangel).

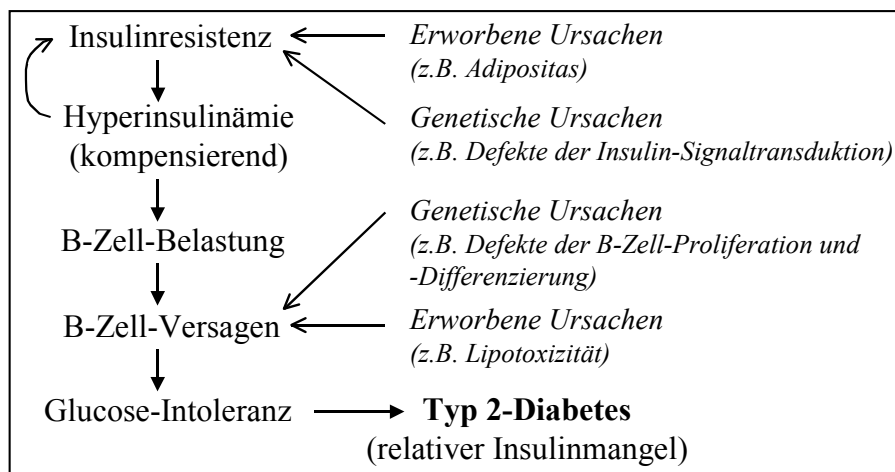
Eine eigene Kategorie in der Diabetes-Einteilung stellen alle Formen des Gestationsdiabetes dar. Bedingt möglicherweise durch die hormonelle Belastungssituation entwickelt sich bei 6 % aller Schwangerschaften ein reversibler oder auch irreversibler Diabetes ähnlich dem eines Typ 2-Diabetes. Risikofaktoren sind höheres Alter und Adipositas der Mutter und Diabetes in der Familienanamnese. Unbehandelt nimmt das Risiko von Frühgeburten, erhöhtem Geburtsgewicht sowie gesteigerter perinataler Morbidität und Mortalität des Neugeborenen zu. Außerdem ist Typ 2-Diabetesrate bei den Kindern erhöht (LANG und LINN, 2001).

Die 4. Kategorie umfasst alle anderen spezifischen Formen des Diabetes mit bekannter Ursache (sekundärer Diabetes). Hierzu zählt man MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young, 2-3 % aller Diabetiker), eine Zusammenfassung verschiedener monogenetischer Erkrankungen (z.B. Mutation im Glucokinase-Gen auf Chromosom 7), die autosomal-dominant vererbt werden und sich meist vor dem 25. Lebensjahr manifestieren. Die Erkrankung verläuft häufig mild, kann sich aber auch ähnlich dem Typ 2-Diabetes zum schwerwiegenden Diabetes entwickeln. Zu den sekundär bedingten Diabetesformen gehören des weiteren noch genetische Defekte des Insulin-Rezeptors, endokrine Erkrankungen (Morbus Cushing, Hyperthyreose) oder Erkrankungen des Pankreas (Pankreatitis, Pankreatektomie, Mucoviszidose). Auch durch Pharmaka wie Glucocorticoide,  $\beta_2$ -Blocker oder Diazoxid kann ein sekundärer Diabetes ausgelöst werden.

### **1.1.2 Ursachen und Pathogenese des Typ 2-Diabetes**

Die Pathogenese des Typ 2-Diabetes (Abb. 1.1) ist bis heute nicht abschließend geklärt. Als Ursache gelten zum einen eine Insulinresistenz und des weiteren ein Defekt der pankreatischen B-Zellen (HENRIKSEN et al., 1994). Die Insulinresistenz kann gegeben sein durch eine genetische Veranlagung (z.B. Defekte der Insulin-Signaltransduktion) und/oder durch Übergewicht-bedingte Stoffwechselveränderungen (SALTIEL, 2001). Ein B-Zell-Defekt kann ebenfalls aus einer genetischen Veranlagung resultieren (z.B. Defekte der B-Zell-Proliferation und -Differenzierung; DOSTOU und GERICH, 2001), kann aber auch erworben sein: So führt eine chronische Hyperlipidämie zu einer Schädigung von B-Zellen („Lipotoxizität“; UNGER, 1995), ist aber möglicherweise auch verantwortlich für eine Entkopplung der mitochondrialen Energieproduktion und damit Hemmung der Insulinsekretion durch Überexpression von UCP2 (Uncoupling protein 2) in der B-Zelle (O'RAHILLY, 2001). Eine Insulinresistenz kann

bereits Jahrzehnte vor der klinischen Manifestation des Typ 2-Diabetes bestehen. Bei übergewichtigen Personen findet man häufig eine Insulinresistenz, aber nur 33 % dieser Personen entwickeln einen Diabetes. Daraus ist abzuleiten, dass Adipositas bzw. Insulinresistenz nicht die alleinigen Ursachen für die Erkrankung sein können, sondern dass vielmehr noch ein Defekt der B-Zellen dazukommen muss, damit die Kompensation der Insulinresistenz nicht mehr möglich ist. Unklar ist, ob der primäre Defekt, der zur Ausbildung eines Typ 2-Diabetes führt, die Insulinresistenz oder die B-Zell-Insuffizienz ist. Um dieser Frage nachzugehen, haben VAN HAEFTEN et al. (1998) die Insulinsekretion als Antwort auf eine konstante Glucosebelastung von 10 mM über 3 Stunden bei zwei Gruppen (gesunde Personen mit oder ohne einem an Typ 2-Diabetes erkrankten Elternteil, beide Gruppen mit gleichen Stoffwechselfparametern) verglichen. Die Probanden mit diabetischem Elternteil reagierten mit einer niedrigeren Insulinsekretion als diejenigen ohne Diabetiker in der Verwandtschaft. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass ein genetisch bedingter B-Zell-Defekt die primäre Rolle bei der Entstehung des Typ 2-Diabetes spielt.



**Abb. 1.1** Pathogenese und Ursachen von Typ 2-Diabetes. Genetische Veranlagung und Übergewicht-bedingte Stoffwechsel-Veränderungen führen zu einer verminderten Verwertung von Glucose in Muskel- und Fettgewebe. Dies hat eine Insulinresistenz zur Folge, d.h. eine

normale Insulinkonzentration bewirkt keine adäquate Blutzuckersenkung. Um die Insulinresistenz zu kompensieren, reagieren die pankreatischen B-Zellen mit einer vermehrten Insulinsekretion (Hyperinsulinämie), was allerdings die Insulinresistenz noch verstärkt. Die verstärkte Insulinsekretion belastet die B-Zellen und führt schließlich zu deren Versagen, so dass eine Glucose-Intoleranz resultiert, d.h. eine Unfähigkeit des Organismus, resorbierte Glucose aus dem Blut in Muskel- und Fettgewebe zu transportieren. Die Voraussetzung für das Versagen der B-Zellen wird geschaffen durch genetische oder auch erworbene Defekte wie Lipotoxizität. Aus einer Glucose-Intoleranz (Prädiabetes) kann sich ein Typ 2-Diabetes entwickeln. Dieser manifestiert sich zunächst als ein relativer Insulinmangel.

Um eine bestehende Insulinresistenz zu kompensieren, sezernieren die pankreatischen B-Zellen verstärkt Insulin. Ermöglicht wird diese Hypersekretion durch Proliferation der B-Zellen (PICK et al., 1998) und/oder eine verstärkte Expression des Hexokinase-Gens (Hexoki-

nase hat eine 100fach höhere Affinität zu Glucose als Glucokinase, s. 1.2, und erlaubt so eine Insulinsekretion auch schon bei geringeren Glucosekonzentrationen; COCKBURN et al., 1997). Die resultierende Hyperinsulinämie kann eine Verschlimmerung der Insulinresistenz bewirken, z.B. durch Down-Regulation der Insulinrezeptoren. Die verstärkte Belastung der schon im Vorfeld durch z.B. einen genetischen Defekt in ihrer Funktion beeinträchtigten B-Zellen führt schließlich zu deren Versagen. Das bedeutet, dass die Glucose-Homöostase im Blut nicht mehr gewährleistet ist (Glucose-Intoleranz, „Prädiabetes“), was sich in Form eines Typ 2-Diabetes manifestieren kann (Abb. 1.1). Typ 2-Diabetes ist durch einen zunächst nur relativen Insulinmangel gekennzeichnet. Bei progredientem Verlauf der Erkrankung kann ein wachsender Insulinmangel eine Verabreichung von Insulin erforderlich machen.

### **1.1.3 Therapie des Typ 2-Diabetes**

Jedem neu diagnostizierten Typ 2-Diabetiker wird zunächst eine Umstellung seiner Lebensgewohnheiten, verstärkte Bewegung und meist auch eine Gewichtsreduktion empfohlen. Lässt sich mit diesen Maßnahmen keine zufriedenstellende Senkung der Blutglucosespiegel erreichen ( $\text{HbA}_{1c} > 7,0 \%$  nach 3 Monaten), kommen orale Antidiabetika zum Einsatz. Gemäß den Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (2002) werden übergewichtige Patienten mit dem Biguanid Metformin behandelt. Metformin entfaltet seinen blutzuckersenkenden Effekt hauptsächlich durch Verstärkung der Insulin-induzierten Hemmung der hepatischen Gluconeogenese (WOLLEN und BAILEY, 1988).

Normalgewichtige Typ 2-Diabetiker können dagegen mit Sulfonylharnstoffen wie Glibenclamid therapiert werden. Sulfonylharnstoffe stimulieren die Insulinfreisetzung durch Hemmung der Öffnungsaktivität der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle in der B-Zellmembran (STURGESS et al., 1985; TRUBE et al., 1986; PANTEN et al., 1996; s. 1.2). Dieser Effekt ist unabhängig von der Anwesenheit von Glucose (MALAISSE et al., 1967; GORUS et al., 1988). Nachteil von Sulfonylharnstoffen ist neben der Glucose-unabhängigen Auslösung einer Insulinsekretion die lange und damit unphysiologische Wirkdauer (Glibenclamid wird in der B-Zelle gespeichert), welche die Gefahr von Hypoglykämien mit sich bringt (FERNER und NEIL, 1988) und die Patienten zu starren Ess-Schemata zwingt. Außerdem verhindern Sulfonylharnstoffe nicht das Auftreten von Blutglucose-Spitzen während der Mahlzeiten (GROOP et al., 1991). Physiologischer als Sulfonylharnstoffe wirken neuere Arzneistoffe, die sogenannten Sulfonylharnstoff-Analoga (Repaglinid, Nateglinid). Ihr Wirkmechanismus entspricht dem der Sulfonylharnstoffe (FUJITA et al., 1996; FUHLENDORFF et al., 1998), jedoch ist ihre Pharmakokinetik eine andere: sie fluten schneller an und werden schneller abgebaut (KIKUCHI, 1996). Somit ist

eine mahlzeitenbezogene Einnahme möglich („prandiale Glucoseregulatoren“) und Hypoglykämien treten möglicherweise seltener auf (TRONIER et al., 1995; IKENOUE et al., 1997).

Als Alternative zu Metformin und Sulfonylharnstoffen bzw. in Kombination dazu können  $\alpha$ -Glucosidase-Hemmstoffe wie Acarbose eingesetzt werden, welche durch kompetitive Hemmung intestinaler  $\alpha$ -Glucosidasen den Abbau von Stärke und Saccharose beeinträchtigen und daher die Resorption von Glucose aus dem Dünndarm verzögern.

Kann mit einer Monotherapie nach 3 Monaten keine befriedigende Stoffwechseleinstellung erreicht werden, wird eine Kombinationstherapie mit einem zweiten oralen Antidiabetikum durchgeführt. Hierbei kann die neuere Arzneistoffgruppe der PPAR $\gamma$ -Agonisten (Rosiglitazon, Pioglitazon) zum Einsatz kommen. PPAR $\gamma$ -Agonisten, auch genannt Insulin-Sensitizer, wirken in den Zielzellen des Insulins, speziell in Fett- und Muskelzellen. Die Substanzen interagieren mit dem intranukleären Peroxisom Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  (LEHMANN et al., 1995). Dieser Rezeptor ändert u.a. die Genexpression für Proteine, die für die Insulin-Signaltransduktion (LAMBE und TUGWOOD, 1996; HAYAKAWA et al., 1996) und für das Einschleusen von Glucose in die Zelle über Glut-4-Transporter (SANDOUK et al., 1993) verantwortlich sind.

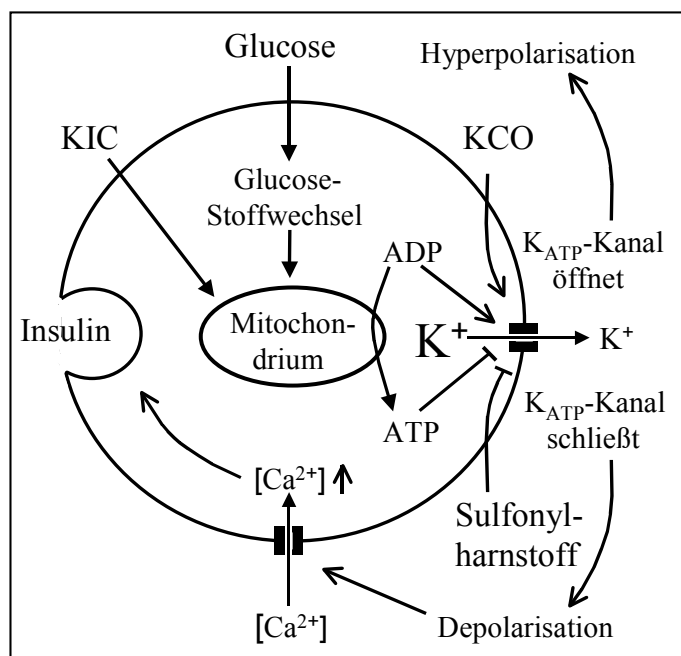
Bei ungenügendem Therapieerfolg mit oralen Antidiabetika wird auf die Gabe von Insulin umgestellt.

## **1.2 Insulinsekretion durch pankreatische B-Zellen**

Die Langerhans-Inseln machen 1 % der Masse des Pankreas aus. Die menschliche Bauchspeicheldrüse enthält etwa 1 Million Inseln mit jeweils 1000-5000 Zellen. Eine Pankreas-Insel enthält 60 % B-Zellen, 30 % A-Zellen und 10 % D-Zellen oder PP-Zellen. Die B-Zellen sind die einzigen Körperzellen, die Insulin produzieren (Ausnahme manche Tumorzellen). Der Hauptstimulator für eine Insulinsekretion durch die B-Zellen ist Glucose, allerdings wird Insulin auch als Antwort auf Aminosäuren und Fettsäuren abgegeben. Das Ausmaß der sekretorischen Antwort auf einen Glucosereiz wird modifiziert durch eine Reihe neuronaler (Acetylcholin, Noradrenalin) und hormonaler (z.B. Glucagon, Glucagon-like peptide 1, Somatostatin) Faktoren. Glucose stimuliert nicht nur die schnelle Insulin-Exozytose, sondern auch die Insulin-Biosynthese, die Genexpression der B-Zellen und die B-Zell-Proliferation über einen Zeitraum von Tagen bis Monaten.

Glucose wird mittels des Glut-2-Transporters in die B-Zelle befördert. Dieser Transporter hat eine relativ niedrige Affinität zu Glucose, so dass die Transportrate mit der Blutglucose-Konzentration korreliert. Im Zytoplasma der B-Zelle wird Glucose unter ATP-

Verbrauch zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert. Dieser erste Schritt der Glykolyse wird durch das Enzym Glucokinase katalysiert. Glucokinase fungiert als „Glucosensor“ der Zelle, denn aufgrund seines hohen  $K_M$ -Wertes von 10 mM variiert das Enzym seine Aktivität gerade im Bereich der (patho)physiologischen Blutglucose-Konzentrationen. Somit wird die Geschwindigkeit des Glucose-Metabolismus immer genau an das momentane Glucoseangebot angepasst (MATSCHINSKY, 1996). Glucose wird via Glykolyse und Citratzyklus verstoffwechselt und steigert so die ATP-Bildung. Die B-Zelle ist wahrscheinlich die einzige Körperzelle, deren ATP-Produktion durch die Blutglucose-Konzentration gesteuert wird. Durch den resultierenden Anstieg der ATP-Konzentration und Abfall der ADP-Konzentration im Zytosol kommt es zur Hemmung der Öffnungsaktivität von ATP-empfindlichen  $K^+$ -Kanälen ( $K_{ATP}$ -Kanäle; ASHCROFT et al., 1994). Das Schließen der  $K_{ATP}$ -Kanäle führt zur Depolarisation der Plasmamembran, zur Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle und zu einer Verstärkung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms in das Zytosol (ASHCROFT und RORSMAN, 1989). Der resultierende Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration induziert die Freisetzung von Insulin (HENQUIN, 1987). Neben ATP und ADP interagieren auch Pharmaka mit dem  $K_{ATP}$ -Kanal. So führen die als orale Antidiabetika eingesetzten Sulfonylharnstoffe zu einer Blockade des  $K_{ATP}$ -Kanals, während Kaliumkanal-Öffner (KCO) wie Diazoxid eine Öffnung bewirken (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2** Stimulation der Insulinsekretion in der B-Zelle (PANTEN, 1998, unveröffentlichte Abbildung.). Die Hemmung der Öffnungsaktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals durch einen Anstieg bzw. Abfall der zytosolischen Konzentrationen von ATP bzw. ADP oder durch Sulfonylharnstoffe führt zur Depolarisation der Plasmamembran, zur Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle und zu einer Verstärkung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms in das Zytosol. Der resultierende Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration induziert die Freisetzung von Insulin. Die ATP-Konzentration steigt an und die ADP-Konzentration fällt ab, wenn der mitochondriale Citratzyklus durch Nährstoffe (z.B. Glucose oder  $\alpha$ -Ketoisocaproinsäure = KIC) ausreichend aktiviert ist. KIC steigert die ATP-Produktion ausschließlich durch ihren intramitochondrialen Stoffwechsel, während beim Glucose-Metabolismus auch die Glykolyse zur ATP-Produktion beiträgt. Ein Anstieg der extrazellulären Glucosekonzentration steigert die Phosphorylierung von Glucose durch die Glucokinase, dem geschwindigkeitsbegrenzenden Enzym für die Verstoffwechselung von Glucose in der B-Zelle. (KCO = Kaliumkanal-Öffner)

lus durch Nährstoffe (z.B. Glucose oder  $\alpha$ -Ketoisocaproinsäure = KIC) ausreichend aktiviert ist. KIC steigert die ATP-Produktion ausschließlich durch ihren intramitochondrialen Stoffwechsel, während beim Glucose-Metabolismus auch die Glykolyse zur ATP-Produktion beiträgt. Ein Anstieg der extrazellulären Glucosekonzentration steigert die Phosphorylierung von Glucose durch die Glucokinase, dem geschwindigkeitsbegrenzenden Enzym für die Verstoffwechselung von Glucose in der B-Zelle. (KCO = Kaliumkanal-Öffner)

### 1.3 $K_{ATP}$ -Kanäle

#### 1.3.1 Funktion und Kontrolle des $K_{ATP}$ -Kanals der B-Zelle

Die ATP-empfindlichen  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) der B-Zelle dienen als Kopplungsglied zwischen den Glucose-induzierten metabolischen Änderungen und der elektrischen Aktivität und sind somit für die Stimulus-Sekretionskopplung von wichtiger Bedeutung (ASHCROFT und ASHCROFT, 1990; PANTEN et al., 1992). Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Membranpotential einer ruhenden B-Zelle Werte um  $-70$  mV aufweist (ASHCROFT und RORSMAN, 1989). Die  $K_{ATP}$ -Kanäle zählen zu den einwärtsgerichteten  $K^+$ -Kanälen (inward rectifiers), da sie eine Asymmetrie in ihrer Leitfähigkeit aufweisen: Der Einwärtsstrom von  $K^+$ -Ionen bei negativerem Potential als  $-90$  mV ist größer als der Auswärtsstrom bei betragsgleichem positiverem Potential (ASHCROFT und RORSMAN, 1989). Das Ruhepotential der Zelle wird durch Ausstrom von  $K^+$ -Ionen durch geöffnete  $K_{ATP}$ -Kanäle aufrecht erhalten, wobei in der ruhenden B-Zelle nur 6-8 % aller  $K_{ATP}$ -Kanäle geöffnet sind (PANTEN et al., 1990). Fällt der Anteil offener  $K_{ATP}$ -Kanäle unter 3 %, so wird das Schwellenpotential zur Aktivierung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle erreicht (COOK et al., 1988; PANTEN et al., 1990). Dieser Grad der Reduktion der Kanal-Aktivität wird durch Glucosekonzentrationen über 6 mM induziert. Neben Glucose führen auch andere  $\beta$ -zytotrope Substanzen (z.B. KIC) und Sulfonylharnstoffe zu einer Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle (TRUBE et al., 1986; ASHCROFT et al., 1987). Die Nährstoff-induzierte Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals beruht auf einem Anstieg der ATP- und einer Abnahme der ADP-Konzentration an der zytosolischen Seite der B-Zellmembran (s. auch 1.2, Abb. 1.2). Hierbei wird die Aktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals über mindestens drei unabhängige Bindungsstellen für zytosolische Nukleotide reguliert:

1. Es existiert eine Bindungsstelle für ATP und verwandte Nukleotide (freies ADP, GTP, GDP), deren Besetzung den  $K_{ATP}$ -Kanal sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen hemmt (COOK und HALES, 1984). Diese Bindungsstelle befindet sich auf der  $K_{IR6.2}$ -Untereinheit (s. 1.3.2) des  $K_{ATP}$ -Kanals (TUCKER et al., 1997). Die Besetzung einer einzigen der 4 ATP-Bindungsstellen pro Kanalkomplex reicht aus, um den Kanal zu schließen (MARKWORTH et al., 2000).
2. Über eine weitere unabhängige Bindungsstelle führen Magnesiumkomplexe von ADP (MgADP) sowie von anderen Nukleosiddiphosphaten (GDP, UDP) zu einer Aktivierung des  $K_{ATP}$ -Kanals (FINDLAY, 1987; ASHCROFT und RORSMAN, 1989).
3. Die Applikation von Magnesiumkomplexen von ATP (MgATP) verhindert die in der Inside-out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik (s. 3.5.4) beobachtete und als „run-down“-

Effekt bezeichnete Abnahme der  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität (OHNO-SHOSAKU et al., 1987). Möglicherweise wird dieser Effekt über dieselbe Bindungsstelle vermittelt, an der Hydrolyse von MgATP erfolgt, eine Voraussetzung für die Wirksamkeit von aktivierenden Nukleosiddiphosphaten (SCHWANSTECHEER et al., 1998).

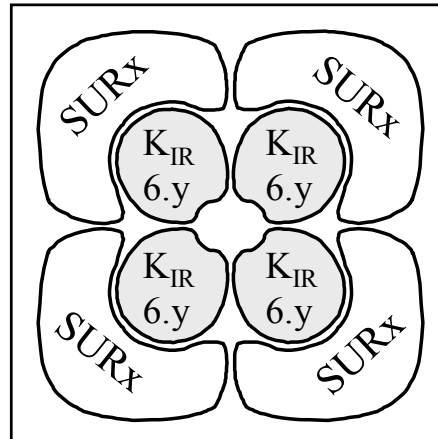
### 1.3.2 Struktur von $K_{ATP}$ -Kanälen

Die  $K_{ATP}$ -Kanäle der B-Zelle setzen sich aus einer Untereinheit ( $K_{IR6.2}$ ), die einen einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal bildet, und einer regulatorischen Untereinheit, dem Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR1), zusammen (AGUILAR-BRYAN et al., 1995; INAGAKI et al., 1995, 1996). Je 4 dieser beiden Untereinheiten bilden eine tetradimere ( $SUR1/K_{IR6.2}$ )<sub>4</sub> Stöchiometrie aus (CLEMENT et al., 1997; INAGAKI et al., 1997). Die Pore des Kanals wird durch 4  $K_{IR}$ -Untereinheiten gebildet, welche die Kaliumselektivität sowie die Eigenschaft der Einwärtsgleichrichtung und der Kanalhemmung durch ATP bestimmen. Die 4  $K_{IR6.2}$ -Elemente sind umgeben von 4 wahrscheinlich konzentrisch angeordneten, regulatorisch wirkenden SUR1-Untereinheiten, die dem  $K_{ATP}$ -Kanal die Empfindlichkeit für Sulfonylharnstoffe, so genannte Kaliumkanal-Öffner und Magnesiumkomplexe von Nukleotiden verleihen (Abb. 1.3). Sowohl SUR1 als auch  $K_{IR6.2}$  enthalten Retentionssignale, die bei einer nicht korrekten Zusammensetzung des  $K_{ATP}$ -Kanals die Passage eines neu gebildeten Kanals zur Zellmembran verhindern, so dass nur  $K_{ATP}$ -Kanäle mit tetradimerer Stöchiometrie die Zellmembran erreichen (ZERANGUE et al., 1999).

$K_{ATP}$ -Kanäle wurden nicht nur in der pankreatischen B-Zelle gefunden, sondern auch in zahlreichen Neuronen, in Herz- und Skelettmuskelzellen und in glatten Gefäßmuskelzellen (ASHCROFT und ASHCROFT, 1990; LAZDUNSKI, 1996). In all diesen Zellen könnten  $K_{ATP}$ -Kanäle für die Kopplung des metabolischen Status an die elektrische Aktivität von Bedeutung sein (NOMA, 1983; MISLER et al., 1986; ASHCROFT, 1988). Im Herzen und in Neuronen könnten sie bei Ischämie an der Regulation der elektrischen Aktivität beteiligt sein (GROSS und AUCHAMPACH, 1992). Unter ischämischen Bedingungen kommt es vermutlich zu einer Öffnung der unter normalen Bedingungen hauptsächlich geschlossenen Kanäle (NICHOLS und LEDERER, 1991; PANTEN et al., 1996), was mit einem geringeren  $Ca^{2+}$ -Einstrom und damit auch geringerem ATP-Verbrauch verbunden ist (JIANG et al., 1992; GROVER, 1994; PANTEN et al., 1996). In der glatten Gefäßmuskulatur scheinen sie für die Regulation des Tonus von zentraler Bedeutung zu sein (DAVIES et al., 1991). Während die  $K_{ATP}$ -Kanäle der Neurone meistens wie bei der B-Zelle aus der SUR1- und der  $K_{IR6.2}$ -Untereinheit zusammengesetzt sind (INAGAKI et al., 1995), repräsentieren SUR2A/ $K_{IR6.2}$ -Kanäle wahrscheinlich die  $K_{ATP}$ -



Kanäle des Herzens bzw. der Skelettmuskulatur (INAGAKI et al., 1996; BABENKO et al., 1998) und SUR2B/K<sub>IR</sub>6.1 (oder K<sub>IR</sub>6.2) -Kanäle vermutlich die K<sub>ATP</sub>-Kanäle der glatten Muskulatur (ISOMOTO et al., 1996; INAGAKI et al., 1996; YAMADA et al., 1997) (SUR2A und SUR2B stellen Isoformen zu SUR1 dar, s. 1.4.2). Die verschiedenen K<sub>ATP</sub>-Kanäle besitzen jeweils eine tetradimere (SURx/K<sub>IR</sub>6.y)<sub>4</sub> Struktur (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3** Tetradimere Struktur des K<sub>ATP</sub>-Kanals (nach CLEMENT et al., 1997). Der K<sub>ATP</sub>-Kanal besteht aus 4 SURx-Untereinheiten und 4 K<sub>IR</sub>6.y-Untereinheiten. Die 4 K<sub>IR</sub>-Untereinheiten bilden die K<sup>+</sup>-selektive Pore, während die 4 regulatorisch wirkenden SUR-Untereinheiten dem K<sub>ATP</sub>-Kanal die Empfindlichkeit für Sulfonylharnstoffe, Kaliumkanal-Öffner und Magnesiumkomplexe von Nukleotiden verleihen.

### 1.3.3 Weitere Ionenkanäle der B-Zelle

Neben den K<sub>ATP</sub>-Kanälen der B-Zelle, die eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und der Auslösung einer Depolarisation spielen, wurden noch weitere Ionenkanäle gefunden, deren Funktionen allerdings bislang noch nicht abschließend charakterisiert worden sind. Zuständig für die Repolarisation der depolarisierten B-Zelle sind Calcium- und spannungsabhängige Kaliumkanäle (K<sub>Ca</sub>) und verzögert gleichrichtende Kaliumkanäle (K<sub>DR</sub>) (DUNNE et al., 1994). Neben den L-Typ Calciumkanälen, deren Rolle bei der Auslösung einer Insulinsekretion gut verstanden ist (s. 1.2), wurden auch Calciumkanäle des T-Typs identifiziert (SATIN und COOK, 1988), die möglicherweise auch in die Kontrolle der Insulinsekretion involviert sind (SATIN und SMOLEN, 1994). Spannungsabhängige Natriumkanäle könnten zur Entstehung eines Aktionspotentials beitragen (PRESSEL und MISLER, 1990), aber die Rolle dieser Kanäle wird allgemein als gering erachtet. Ein ATP-empfindlicher Chloridkanal, der durch ATP, cAMP, Glibenclamid und Zellschwellung (bedingt durch hypotone Umgebung) aktiviert wird, wurde erstmals 1995 beschrieben (KINARD und SATIN). Da der Kanal durch intrazelluläres ATP aktiviert wird, scheint er unter metabolischer Kontrolle zu stehen (KINARD und SATIN, 1995). Dieser Volumen-empfindliche Chloridkanal könnte eine

Rolle spielen bei der Insulinsekretion, die durch eine hypotone Zellumgebung induziert wird: Die hypoton-bedingte Zellschwellung führt möglicherweise zur Aktivierung der Chloridkanäle und somit zur Depolarisation der B-Zelle (BEST et al., 1996). Nährstoffe wie Glucose oder  $\alpha$ -Ketoisocaprinsäure (KIC) bewirken bei einem Membranpotential von  $-60$  bis  $-70$  mV negative Auswärtsströme, die denen ähneln, die durch ein hypotones Medium ausgelöst werden (BEST, 1997). Diese Nährstoff-induzierten negativen Auswärtsströme werden durch Anionenkanal-Blocker aufgehoben. Deshalb ist anzunehmen, dass sie durch den Volumenempfindlichen Chloridkanal zustande kommen. Die Aktivierung von Chloridkanälen könnte die Intensität der elektrischen und damit sekretorischen Aktivität der B-Zelle während der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion erhöhen (BEST, 1997). Auch der Glucose-induzierte  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Mechanismus der Insulinsekretion (s. 1.5) könnte zumindest zum Teil die Aktivierung des Volumenempfindlichen Chloridkanals durch Glucose involvieren, denn das Zufügen von 16 mM Glucose zu mit 500  $\mu$ M Tolbutamid inkubierten Ratten-B-Zellen bewirkt eine Depolarisation bzw. elektrische Aktivität der Zelle sowie Auswärtsströme durch Chloridkanäle bei  $-70$  mV, aber keine Änderung der  $K^+$ -Leitfähigkeit (BEST, 2002).

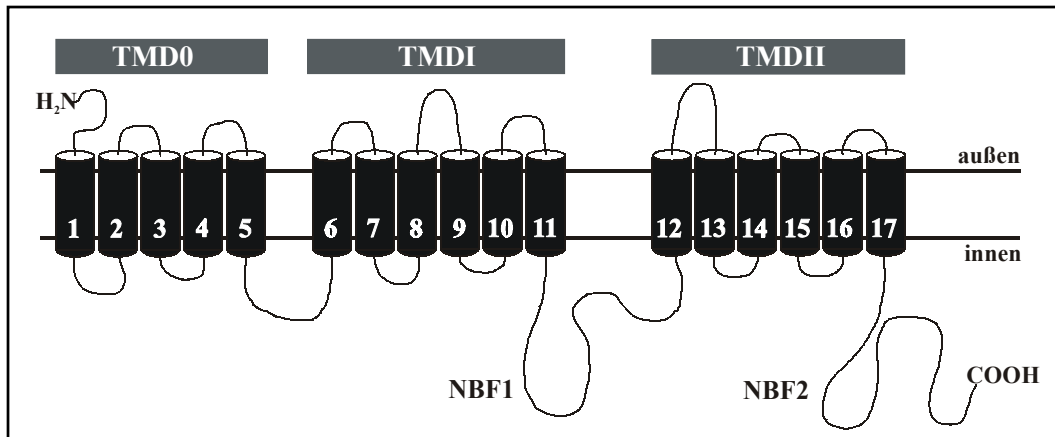
## 1.4 Sulfonylharnstoff-Rezeptoren

### 1.4.1 Nachweis in Geweben und Aufbau

Eine hochaffine Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe wurde in mikrosomalen Membranpräparationen aus Pankreasinseln oder Insulin-sezernierenden Zellen nachgewiesen (GEISEN et al., 1985; PANTEN et al., 1992; GOPALAKRISHNAN et al., 1993).  $K_{ATP}$ -Kanal-blockierende sowie Insulin-freisetzende Potenz der Sulfonylharnstoffe einerseits und Affinität der Sulfonylharnstoffe für Membranbindung andererseits korrelieren eng. Daher repräsentiert die hochaffine Bindungsstelle in den Membranpräparationen wahrscheinlich den Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SCHMID-ANTOMARCHI et al., 1987; GAINES et al., 1988; PANTEN et al., 1989).

Sulfonylharnstoff-Rezeptoren (SUR) sind Mitglieder der Familie der ABC-Transporter (ABC = ATP-binding cassette) und sind daher verwandt mit dem Multidrug Resistance Protein (MDR), dem Multidrug Related Protein (MRP) und dem Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) (AGUILAR-BRYAN et al., 1995). ABC-Transporter sind aus vier Kerndomänen aufgebaut, nämlich zwei transmembranären (TMD) und zwei Nukleotid-bindenden (NBF1 und NBF2) Domänen (HIGGINS, 1995). Die beiden NBFs befinden sich auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran und hydrolysieren bei den meisten ABC-Transportern ATP, was zum Substanztransport erforderlich ist (HIGGINS, 1992, 1995).

Nach dem Modell für die transmembranäre Topologie anderer ABC-Transporter entwarfen TUSNÁDY et al. (1997) für SUR1 eine transmembranäre Topologie mit fünf (TMD0) und sechs (TMDI) transmembranären Segmenten vor NBF1 und weiteren sechs (TMDII) zwischen NBF1 und NBF2 (Abb. 1.4). Diese SUR1-Topologie wird durch experimentelle Untersuchungen von RAAB-GRAHAM et al. (1999) und CONTI et al. (2001) gestützt.



**Abb. 1.4** Transmembranäre Topologie von SUR1. TMD0 umfasst die transmembranären Segmente 1 – 5, TMDI die Segmente 6 – 11 und TMDII die Segmente 12 – 17. NBF1 und NBF2 kennzeichnen die Nukleotid-bindenden intrazellulären Domänen. Die transmembranäre Topologie von SUR2A und SUR2B ist wahrscheinlich identisch (CONTI et al., 2001).

#### 1.4.2 Subtypen von Sulfonylharnstoff-Rezeptoren

Kurz nach der Klonierung von SUR1 (AGUILAR-BRYAN et al., 1995) wurden zwei weitere Sulfonylharnstoff-Rezeptoren kloniert, SUR2A und SUR2B (INAGAKI et al., 1996; ISOMOTO et al., 1996). SUR2A und SUR2B sind unterschiedliche splice-Produkte desselben Gens auf Chromosom 12 und unterscheiden sich nur in den letzten 42-45 C-terminalen Aminosäuren (CHUTKOW et al., 1996; ISOMOTO et al., 1996). Ihre Aminosäuresequenz stimmt zu 68 % mit derjenigen von SUR1 überein. SUR2A-mRNA findet man im Herzen und in der Skelettmuskulatur, SUR2B-mRNA in allen untersuchten Geweben (CHUTKOW et al., 1996; INAGAKI et al., 1996; ISOMOTO et al., 1996).

Die Empfindlichkeit der K<sub>ATP</sub>-Kanäle gegenüber Sulfonylharnstoffen und Kaliumkanal-Öffnern wird durch die SUR-Untereinheit determiniert. SUR1 bindet Sulfonylharnstoffe (z.B. Glibenclamid oder Glipizid) mit hoher Affinität, die SUR2-Isoformen binden Sulfonylharnstoffe mit etwa 500fach niedrigerer Affinität (DÖRSCHNER et al., 1999). Andererseits werden Kaliumkanal-Öffner (z.B. Diazoxid, Pinacidil) schwächer an SUR1 als an SUR2A und SUR2B gebunden (SCHWANSTECHEER et al., 1998). Die Bindungsstellen für Sulfonyl-

harnstoffe und Kaliumkanal-Öffner sind wahrscheinlich negativ allosterisch gekoppelt (SCHWANSTECHEER et al., 1998; HAMBROCK et al., 1998).

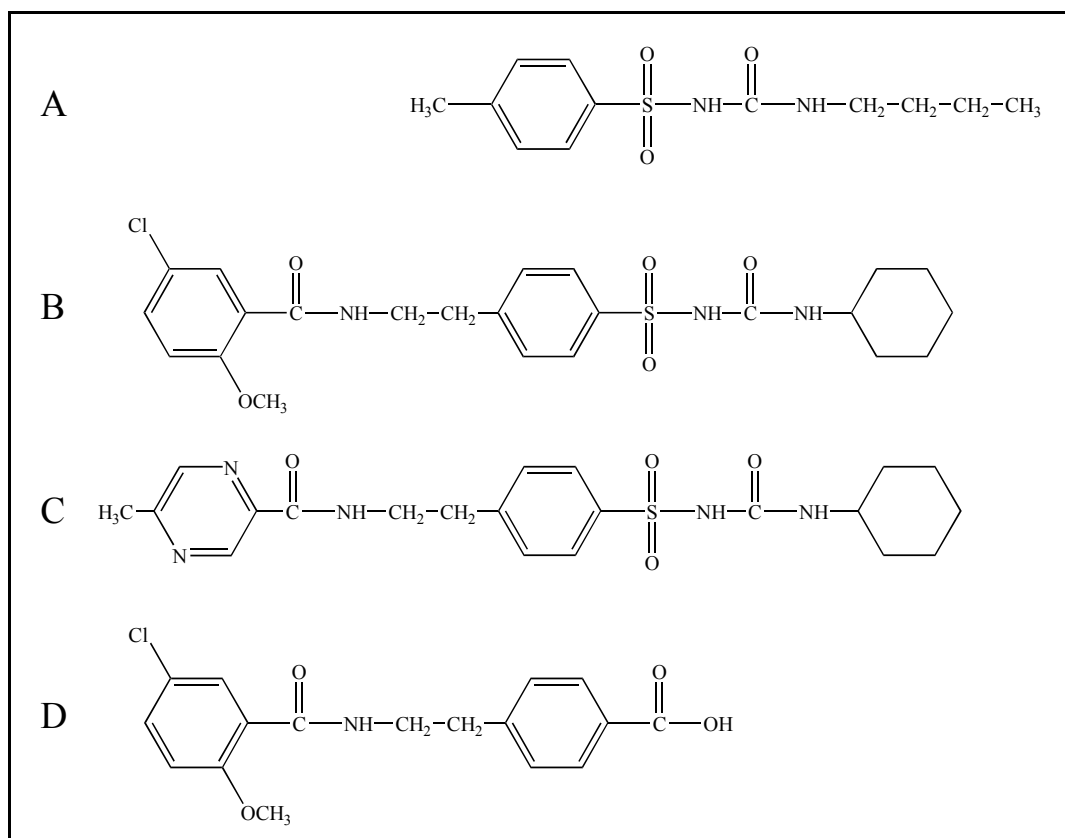
### 1.4.3 Lokalisation der Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe

Sulfonylharnstoffe hemmen den  $K_{ATP}$ -Kanal über eine hochaffine Bindungsstelle (STURGEISS et al., 1985; ASHCROFT und RORSMAN, 1989), die sich auf der intrazellulären Seite der Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit des Kanals befindet (SCHWANSTECHEER et al., 1994). Sulfonylharnstoffe sind schwache organische Säuren ( $pK_s$  4-6), die bei physiologischem pH-Wert überwiegend als Anionen vorliegen. Ihre korrespondierenden undissoziierten Formen sind allerdings sehr lipophil und können deshalb die B-Zellmembran passieren. Daneben erfolgt ein Transport über Carrier für organische Ionen (PANTEN et al., 1989). Innerhalb der TMDII von SUR wurde eine Region aus 114 Aminosäuren identifiziert, die kritisch für die Ausbildung hoher Sulfonylharnstoff-Affinität ist und wahrscheinlich Teil der Sulfonylharnstoff-Bindungsstelle ist (Aminosäuren 1129 – 1242, d.h. die transmembranären Segmente 14 – 15 sowie das dazwischen liegende extrazelluläre Verbindungsstück und Teile der angrenzenden zytosolischen Schleifen; UHDE et al., 1999; ASHFIELD et al., 1999; TOMAN, 2001; s. Abb. 1.4). Zur hochaffinen Bindung von Glibenclamid-ähnlichen Substanzen trägt möglicherweise die zytosolische Schleife zwischen der TMD0 und der TMDI bei (MIKHAILOV et al., 2001). Die TMD0 ist wahrscheinlich nicht an der Ausbildung der Bindungsstelle beteiligt (MIKHAILOV et al., 2001; TOMAN, 2001). SUR1/ $K_{IR}6.2$  oder SUR2/ $K_{IR}6.2$ -Kanäle werden bereits geschlossen, wenn von den pro Kanal vorhandenen vier Sulfonylharnstoff-Bindungsstellen lediglich eine von einem Liganden besetzt wird (DÖRSCHNER et al., 1999; GROSS et al., 1999).

### 1.4.4 Affinität von Sulfonylharnstoffen und Analoga zu SUR-Subtypen

Glibenclamid (Abb. 1.5 B) bindet an Membranen aus B-Zellen von Mäusen mit einer Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 0,4 nM (PANTEN et al., 1989; SCHWANSTECHEER et al., 1992). Für rekombinanten SUR1 ist die Dissoziationskonstante sehr ähnlich ( $K_D = 0,55$  nM; DÖRSCHNER et al., 1999). Dagegen liegen für die rekombinanten SUR2-Isoformen die Dissoziationskonstanten 500fach höher als für SUR1 ( $K_D = 0,29$   $\mu$ M bzw. 0,25  $\mu$ M für SUR2A bzw. SUR2B; DÖRSCHNER et al., 1999). Dies gilt wahrscheinlich für alle therapeutisch eingesetzten Sulfonylharnstoffe, z.B. binden auch Glipizid oder Tolbutamid (Abb. 1.5 C, A) an SUR1 ( $K_D = 17$  nM bzw. 29  $\mu$ M) mit höherer Affinität als an die SUR2-Isoformen ( $K_D = 5,3$   $\mu$ M bzw. 230  $\mu$ M an SUR2A und 6,1  $\mu$ M bzw. 260  $\mu$ M an SUR2B; DÖRSCHNER et al., 1999). Das Benzoessäure-Derivat Meglitinid (Abb. 1.5 D) hingegen bindet an SUR1, SUR2A und SUR2B

mit sehr ähnlichen  $K_D$ -Werten (6,8  $\mu\text{M}$  für SUR1, 7,6  $\mu\text{M}$  bzw. 7,2  $\mu\text{M}$  für SUR2A bzw. SUR2B; MEYER et al., 1999).



**Abb. 1.5** Strukturformeln der Sulfonylharnstoffe Tolbutamid (A), Glibenclamid (B), Glipizid (C) sowie des Benzoessäure-Derivates Meglitinid (D).

MEYER et al. (1999) haben untersucht, welche Strukturelemente von Sulfonylharnstoff-Molekülen und Analoga für eine Bindung an die SUR-Isoformen notwendig sind und welche Strukturelemente für die SUR1-Selektivität des Glibenclamids verantwortlich sind. Demnach wirkt eine anionische Gruppe wie die Sulfonylharnstoff-Funktion oder eine Carboxylgruppe (wie im Meglitinid) im Molekül affinitätssteigernd für die Bindung an alle drei Rezeptor-Isoformen. Dies gilt als klares Indiz dafür, dass die anionische Gruppe an der Rezeptorbindung beteiligt ist. Die SUR1-Selektivität von Glibenclamid ist zurückzuführen auf die lipophile Substitution (Cyclohexylring) der Sulfonylharnstoff-Gruppe (MEYER et al., 1999). Offenbar ist die Bindungstasche der SUR2-Isoformen kleiner als die von SUR1, so dass voluminöse lipophile Substituenten wie der Cyclohexylrest des Glibenclamids dort keinen Platz finden.

## 1.5 $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion

### 1.5.1 Entdeckung und Charakterisierung

Die Beobachtung, dass Glucose auch dann die Insulinsekretion steigert, wenn eine Blockade der  $K_{ATP}$ -Kanäle keine Rolle spielen kann (bei vollständiger Öffnung bzw. Schließung der Kanäle durch Diazoxid bzw. Sulfonylharnstoffe), führte zur Entdeckung der Glucose-induzierten  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion (PANTEN et al., 1988; GEMBAL et al., 1992; AIZAWA et al., 1992). Die Existenz dieses Effektes wurde in neueren Untersuchungen mit SUR1 knockout Mäusen bestätigt. Diese Mäuse ohne funktionsfähigen  $K_{ATP}$ -Kanal zeigten immer noch eine (wenngleich verminderte) Glucose-stimulierte zweite Phase der Insulinsekretion (SEGHERS et al., 2000). Diese  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion durch Glucose scheint teilweise der zweiten Phase der Glucose-induzierten biphasischen Insulinsekretion zu ähneln (AIZAWA et al., 1992). Es ist anzunehmen, dass die  $K_{ATP}$ -Kanal-abhängige und die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion zusammen für das Zustandekommen des typischen biphasischen Sekretionsmusters der Glucose (Abb. 4.1) verantwortlich sind (KOMATSU et al., 1997). Der  $K_{ATP}$ -Kanal-vermittelte Weg der Insulinsekretion gilt dabei als vorherrschend, deshalb wird der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Weg auch als „amplifizierender“ Weg bezeichnet, also als ein Weg, über den die  $K_{ATP}$ -Kanal-vermittelte Sekretionsantwort auf Glucose und auch auf andere Stimulatoren der Insulinsekretion verstärkt und optimiert wird (HENQUIN, 2000). Die Amplifizierung der Insulinsekretion besteht aus einer Steigerung der Wirksamkeit des zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Signals auf die Insulin-Exozytose und beginnt erst, wenn die zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Wirkung des  $K_{ATP}$ -Kanal-vermittelten Mechanismus erhöht wurde (HENQUIN, 2000). Der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Weg erwies sich als beeinträchtigt in Tiermodellen mit Typ 2-Diabetes (HUGHES et al., 1998). Über den genauen Mechanismus der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion herrscht bislang noch Unklarheit.

### 1.5.2 Produkte des Energiestoffwechsels als Vermittler des $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effektes

Die Glucose-induzierte  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion erfordert die Metabolisierung der Glucose und korreliert dabei in ihrem Ausmaß mit einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses in der B-Zelle. Dies bedeutet, dass die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion an Veränderungen des Energiestatus der Zelle gekoppelt ist (GEMBAL et al., 1993). Bekannt ist auch, dass die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effekte nicht durch einen weiteren Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration vermittelt werden (GEMBAL et al., 1993). Es erscheint vielmehr so, dass die Kopplung des Calciumsignals an die Insulin-Exozytose intensiviert ist

durch einen aktivierten Energiestoffwechsel (RUSTENBECK, 1999). Denkbar ist eine Rolle von Adenin-Nukleotiden wie ATP als Mediatoren dieser Kopplung. Es konnte eine gute Korrelation zwischen der Konzentration von Adenin- und Guanin-Nukleotiden in Inseln von Mäusen und Glucose-induzierter  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängiger Insulinsekretion gefunden werden (DETIMARY et al., 1996). Auch frühere Untersuchungen von PANTEN et al. (1988) kamen zu dem Schluss, dass energiereiche Phosphate wie ATP als Vermittler zwischen Nährstoffmetabolismus in der B-Zelle und  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängiger Insulinsekretion fungieren könnten, weil Nährstoffe, die intra- und extramitochondrial unter ATP-Gewinnung verstoffwechselt werden, eine  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Sekretion hervorriefen. Untersuchungen der Ultrastruktur von B-Zellen haben gezeigt, dass die Mitochondrien häufig in der Nähe der sekretorischen Insulingranula vorzufinden sind (WOLLHEIM, 2000). Diese Lokalisation könnte als ein weiteres Indiz für eine Rolle von ATP als Vermittler zwischen Metabolismus und Insulinfreisetzung gewertet werden, denn fest steht, dass ATP für den Ablauf des exozytotischen Prozesses an mehreren Stellen notwendig ist, z.B. für „Docking“ und Priming (AUGUSTINE et al., 1996) der Sekretionsgranula.

### **1.5.3 Glutamat als Vermittler des $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effektes**

MAECHLER und WOLLHEIM (1999) haben ein Modell für die Kopplung des Glucosemetabolismus an die Insulinsekretion vorgeschlagen, welches intramitochondrial gebildetem Glutamat die Vermittlerrolle bei der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion zuspricht. Dieses Modell besagt, dass die  $K_{ATP}$ -Kanal-vermittelte Insulinsekretion (Glucosemetabolismus, ATP-Produktion, Schließen der  $K_{ATP}$ -Kanäle, Depolarisation der Zellmembran, Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle, Erhöhung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration, Auslösung der Insulinfreisetzung) die erste Phase der sekretorischen Antwort auf Glucose darstellt. Das durch den Glucosemetabolismus hyperpolarisierte Membranpotential der Mitochondrien bewirke bei Vorliegen erhöhter  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen im Zytosol die Aufnahme von  $Ca^{2+}$  in die Mitochondrien. Erhöhte intramitochondriale  $Ca^{2+}$ -Spiegel würden zu einer Aktivierung von Enzymen des Citratzyklus führen. Durch den aktivierten Citratzyklus würden vermehrt Intermediate wie  $\alpha$ -Ketoglutarat gebildet werden, welches durch Reaktion der Glutamat-Dehydrogenase zu Glutamat umgesetzt werde. Die Aufnahme von Glutamat in die insulinhaltigen Sekretionsgranula könnte dann für die Ausprägung der zweiten, d.h. der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Phase der Insulinsekretion entscheidend sein, eventuell durch Priming der Granula (RORSMAN und RENSTRÖM, 1999).

Diese Modellvorstellung wird angezweifelt, denn in anderen Studien bewirkte eine Erhöhung der Glutamatkonzentration in Inselzellen keine Stimulation der Insulinsekretion (MACDONALD und FAHIEN, 2000; YAMADA et al., 2001; BERTRAND et al., 2002). Weiterhin wurde festgestellt, dass Insulin-freisetzende Nährstoffe wie Glucose, Leucin und  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) nicht zu einer Erhöhung der Glutamatkonzentration in Pankreasinseln führen (MACDONALD und FAHIEN, 2000; BERTRAND et al., 2002), sondern dass vielmehr Insulinsekretion mit Glutamatverbrauch assoziiert sein kann (BERTRAND et al., 2002).

## 1.6 Insulinsekretion durch $\alpha$ -Ketomonocarbonsäuren und BCH

$\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC, Abb. 2.1), das Transaminierungsprodukt von Leucin, stimuliert eine schnelle, anhaltende und starke Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln, und dies auch in Abwesenheit anderer Stimulatoren der Insulinsekretion (PANTEN, 1975). Daher zählt KIC neben z.B. Glucose und Sulfonylharnstoffen zu den Initiatoren der Sekretion. Ebenso wie bei der Glucose-induzierten Insulinsekretion wird beim intramitochondrialen Stoffwechsel von KIC die ATP-Produktion der B-Zelle erhöht, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle reduziert und somit die Sekretion ausgelöst wird (ASHCROFT et al., 1987). Wenn jedoch alle  $K_{ATP}$ -Kanäle durch maximal wirksame Sulfonylharnstoff-Konzentrationen geschlossen sind, bewirkt KIC immer noch eine starke  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion, die sogar noch stärker ist als die einer maximal wirksamen Glucosekonzentration (PANTEN et al., 1988).

$\alpha$ -Ketocapronsäure (KC, Abb. 2.1) kann eine ähnlich starke Insulinsekretion initiieren wie ihr Isomer KIC. Wie bei KIC ist die Auslösung der Sekretion unabhängig von der Anwesenheit anderer Stimulatoren der Insulinsekretion (PANTEN, 1975).

$\alpha$ -Ketoisovaleriansäure (KIV, Abb. 2.1), das Transaminierungsprodukt von Valin, ist kein Initiator der Insulinsekretion (PANTEN, 1975), kann aber bei Anwesenheit anderer Stimulatoren der Sekretion eine Insulinsekretion verstärken und gilt daher als Potentiator der Sekretion.

$\beta$ -Phenylpyruvat (PP, Abb. 2.1), das Transaminierungsprodukt von Phenylalanin, kann eine Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln hervorrufen, wenngleich die B-Zelle Phenylalanin nicht abzubauen vermag (PANTEN und LANGER, 1981).  $\beta$ -Phenylpyruvat bewirkt wie KIC und KC eine Insulinsekretion auch in Abwesenheit anderer Stimulatoren der Sekretion (MATSCHINSKY et al., 1975; LENZEN und PANTEN, 1981).

Von den vier Isomeren des BCH (2-Aminobicyclo[2.2.1]heptan-2-carbonsäure, Abb. 2.1) ist (-)-b-BCH ein nicht metabolisierbares Analogon des L-Leucins. BCH wurde bereits

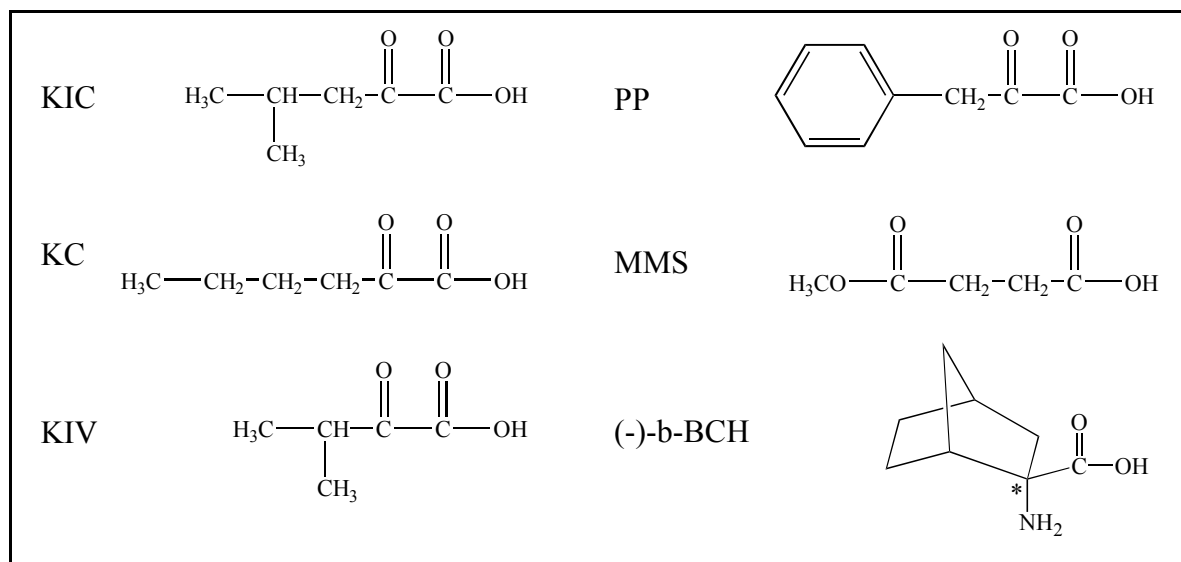


1969 als eine bei Ratten hypoglykämisch wirkende Substanz beschrieben (CHRISTENSEN und CULLEN), allerdings ist lediglich das (-)-b-Isomer ein Initiator der Insulinsekretion (CHRISTENSEN et al., 1971). Die Auslösung einer Insulinsekretion durch eine nicht metabolisierbare Substanz galt vor Entdeckung der  $K_{ATP}$ -Kanäle und deren Funktion als ein Hauptargument dafür, dass die Freisetzung von Insulin durch die Wirkung  $\beta$ -zytotroper Substanzen auf spezifische Rezeptoren der B-Zellmembran hervorgerufen wird (MATSCHINSKY et al., 1972). Die Entdeckung, dass (-)-b-BCH auf allosterischem Weg die Glutamat-Dehydrogenase in den Mitochondrien der B-Zellen zu aktivieren vermag (GYLFE, 1976), veränderte diese Interpretation: Somit kann durch die Wirkung von (-)-b-BCH die Energieproduktion der B-Zelle gesteigert werden (PANTEN et al., 1980; SENER und MALAISSE, 1980).

## 2 ZIELE DER ARBEIT

### 2.1 Mechanismus der durch $\beta$ -zytrotrope Nährstoffe induzierten $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion

Alle  $\beta$ -zytotropen Medikamente, die derzeit in der antidiabetischen Therapie eingesetzt werden (Sulfonylharnstoffe und Analoga), wirken durch Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals der B-Zellen. Dieser Wirkmechanismus bedingt aber, dass gefährliche Hypoglykämien ausgelöst werden können.  $\beta$ -Zytotrope Pharmaka, die diesen unerwünschten Effekt nicht zeigen, dürfen nicht am  $K_{ATP}$ -Kanal angreifen, sondern müssen über andere Mechanismen wirken. Die Entwicklung solcher Medikamente kann vorangetrieben werden, wenn man die Wirkmechanismen der physiologischen Stimulatoren der Insulinsekretion sehr genau kennt. Dies ist für Glucose, den physiologisch wichtigsten Stimulator der Insulinsekretion, nicht der Fall. Zwar wird gut verstanden, auf welche Weise Glucose zur Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle in den B-Zellen führt und dadurch die Sekretion steigert. Dagegen kann aber bisher nicht befriedigend erklärt werden, wie der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Weg der Glucosewirkung zustande kommt. Um diesen Weg besser zu verstehen, sollten die Insulin-freisetzenden Wirkungen von Substanzen (Abb. 2.1) verglichen werden, die in den B-Zellen selbst als Substrate dienen und/oder die Verwertung von endogenem Substrat fördern.

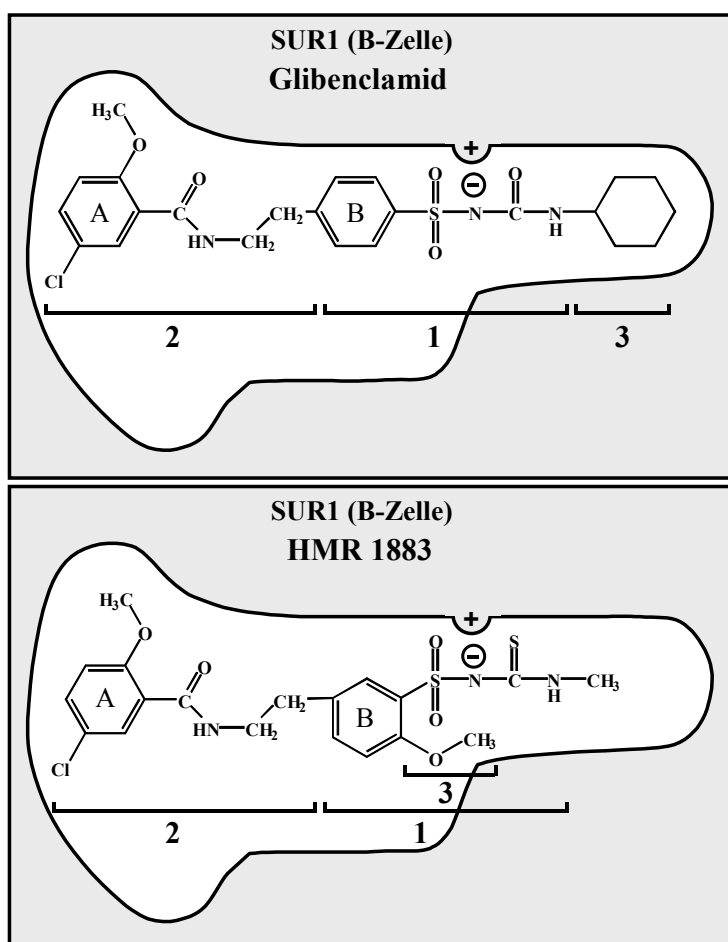


**Abb. 2.1** Strukturformeln von  $\alpha$ -Ketoisocapronat (KIC),  $\alpha$ -Ketocapronat (KC),  $\alpha$ -Ketoisovalerat (KIV),  $\beta$ -Phenylpyruvat (PP), Monomethylsuccinat (MMS) und (-)-b-BCH (Darstellung in undissoziierter Form; \* kennzeichnet das asymmetrische C-Atom). Die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulin-freisetzenden Wirkungen dieser Verbindungen sollten getestet und miteinander verglichen werden.

## 2.2 Strukturelle Voraussetzungen für die Interaktion von Sulfonylharnstoffen und Analoga mit $K_{ATP}$ -Kanälen

An der Wechselwirkung von Glibenclamid und verwandten Liganden mit den Sulfonylharnstoffrezeptor-Subtypen von  $K_{ATP}$ -Kanälen sind drei Bereiche der Moleküle beteiligt (Abb. 2.2):

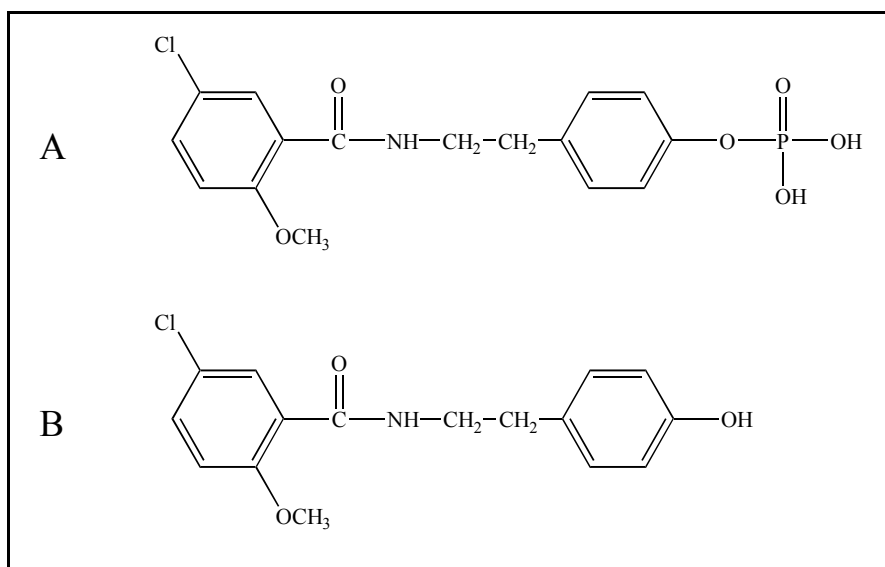
- 1 Ein aromatischer Ring (Ring B), an den in relativ konstantem Abstand eine anionische Gruppe (z.B. Sulfonylharnstoff- oder Carboxylgruppe) geknüpft ist. Die anionische Gruppe steigert die Affinität der Liganden für die Bindung an die SUR-Subtypen (MEYER et al., 1999).
- 2 Ein lipophiler Substituent (Ring A), der über eine kurze aliphatische Brücke, die eine CONH- oder NHCO-Gruppe enthält, mit dem aromatischen Ring B verbunden ist.
- 3 Ein lipophiler Substituent in Nachbarschaft (auch in ortho-Position am Ring B) zur anionischen Gruppe, der dem Liganden die Unterscheidung zwischen SUR1 und SUR2A/SUR2B ermöglicht (MEYER et al., 1999; ENGLERT et al., 2001)



**Abb. 2.2** Modell der Bindungsstellen-Areale für Glibenclamid und HMR 1883 am SUR1 der B-Zelle. Die Bereiche 1, 2 und 3 kennzeichnen die verschiedenen Molekülbereiche, die für die Rezeptorbindung eine Rolle spielen.

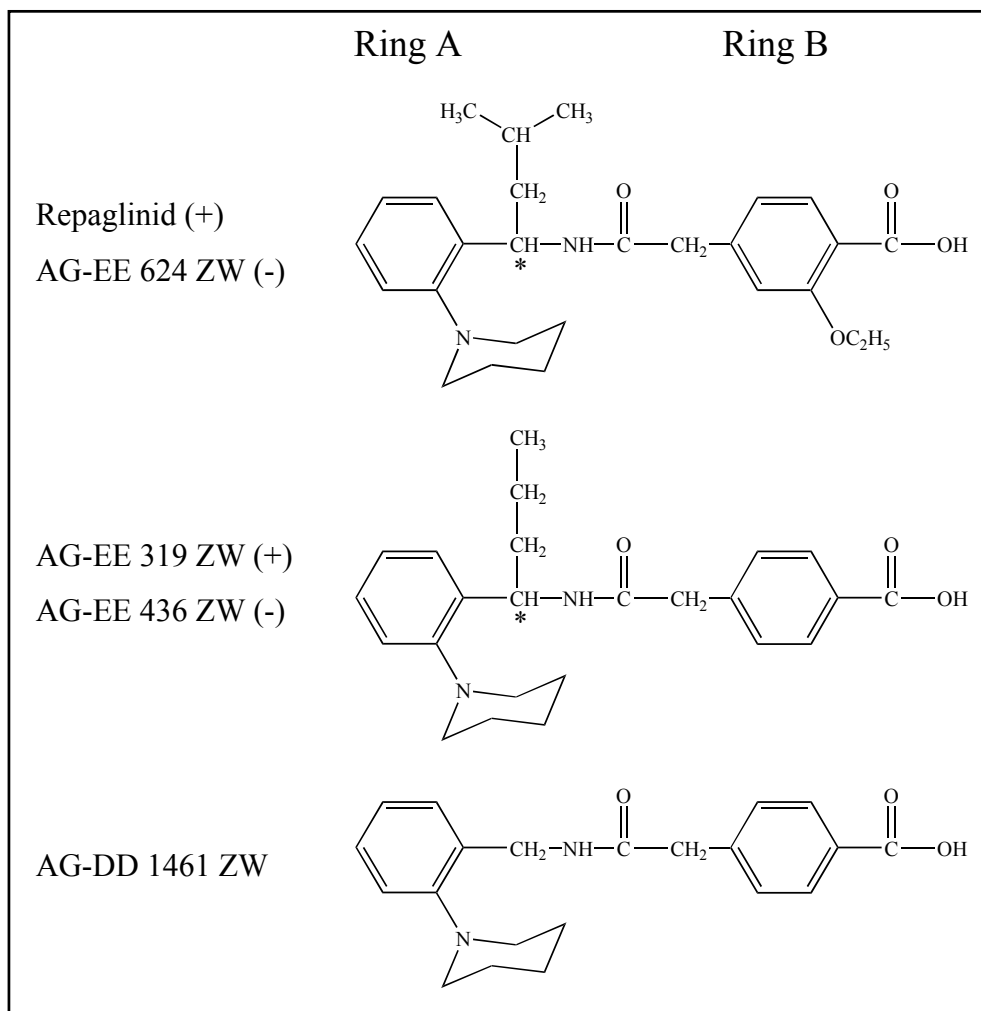
Es sollten Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Interaktion von Sulfonylharnstoffen und Analoga mit  $K_{ATP}$ -Kanälen bzw. SUR-Subtypen erstellt werden, um die genannten drei Bereiche der Sulfonylharnstoff-Bindungsstelle näher zu charakterisieren bzw. um die Wechselwirkung der SUR-Liganden mit ihren Bindungsstellen besser zu verstehen. Im einzelnen sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- (A) Betreffend den Bereich 1: Untersuchung, ob eine Phosphatgruppe die anionische Funktion übernehmen kann (Testsubstanz s. Abb. 2.3 A).



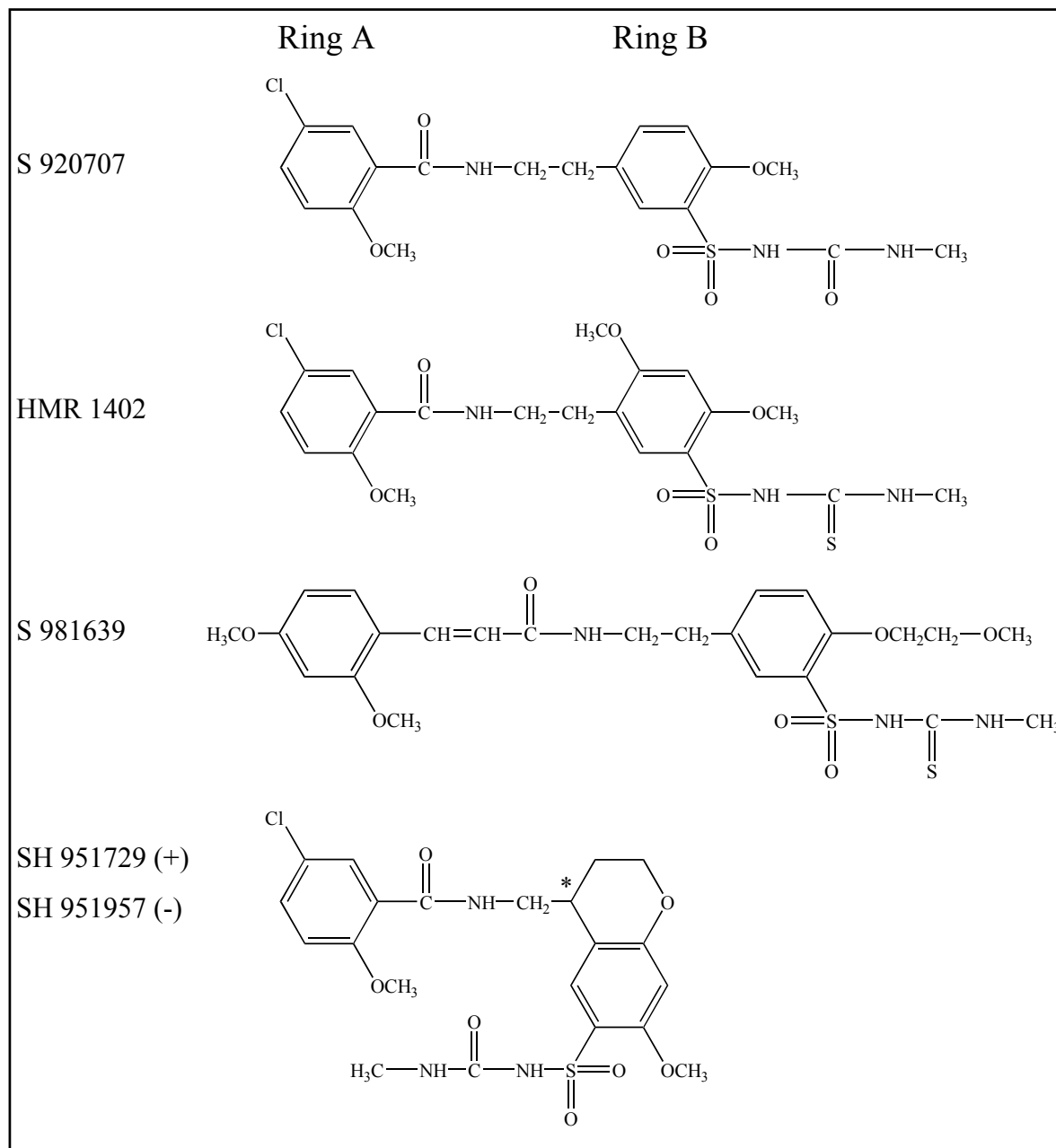
**Abb. 2.3** Strukturformeln von {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat (A) und 5-Chlor-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-2-methoxybenzamid (B). Anhand der Verbindung (A) sollte getestet werden, ob eine Phosphatgruppe die anionische Funktion im Molekül eines Sulfonylharnstoff-Analogons übernehmen kann.

(B) Betreffend den Bereich 2: Untersuchung, wie unterschiedliche Substitution und das Vorliegen von Stereoisomerie im Bereich der die beiden aromatischen Ringe A und B verbindenden Kette die Affinität zu SUR1 und SUR2A/SUR2B beeinflusst (Testsubstanzen s. Abb. 2.4).



**Abb. 2.4** Strukturformeln von Repaglinid, AG-EE 624 ZW, AG-EE 319 ZW, AG-EE 436 ZW und AG-DD 1461 ZW (\* kennzeichnet das asymmetrische C-Atom). Anhand dieser Verbindungen sollte getestet werden, wie unterschiedliche Substitution und das Vorliegen von Stereoisomerie im Bereich der die beiden aromatischen Ringe A und B verbindenden Kette die Affinität zu SUR1 und SUR2A/SUR2B beeinflusst.

(C) Betreffend die Bereiche 2 und 3: Untersuchung, ob Variationen der Kettenlänge zwischen den Benzolringen A und B und ob Substituenten in Nachbarschaft (ortho-Position) zur anionischen Gruppe die Selektivität für SUR2A/SUR2B steigern können (Testsubstanzen s. Abb. 2.5).



**Abb. 2.5** Strukturformeln von S 920707, HMR 1402, S 981639, SH 951729 und SH 951957 (\* kennzeichnet das asymmetrische C-Atom). Anhand dieser Verbindungen sollte getestet werden, ob Variationen der Kettenlänge zwischen den Benzolringen A und B und ob Substituenten in Nachbarschaft (ortho-Position) zur anionischen Gruppe die Selektivität für SUR2A/SUR2B steigern können.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Perfusion isolierter Maus-Pankreasinseln

##### 3.1.1 Basismedium für die Inselisolierung und die Perfusion

Als Basismedium für die Isolierung der Pankreasinseln diente ein modifizierter Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer. Weil durch Entweichen von  $\text{CO}_2$  der Puffer alkalisch werden würde und nur ein fortlaufendes Begasen mit  $\text{CO}_2$  den pH-Wert konstant gehalten hätte, wurde zur Stabilisierung des pH-Wertes ein Teil des Bicarbonats durch den nicht flüchtigen organischen HEPES-Puffer ersetzt (LERNMARK, 1974). Ferner enthielt die im folgenden Krebs-Ringer-Hepes-Albumin (KRHA)-Puffer benannte Lösung noch NaOH und Albumin.

*A) Stammlösung 1 (0,90 % NaCl)*

18,0 g Natriumchlorid (6404, Fa. Merck) wurden in 2 l bidest. Wasser gelöst.

*B) Stammlösung 2 (1,15 % KCl)*

5,75 g Kaliumchlorid (4936, Fa. Merck) wurden in 500 ml bidest. Wasser gelöst.

*C) Stammlösung 3 (1,62 %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )*

8,10 g Calciumchlorid-Dihydrat (2382, Fa. Merck) wurden in 500 ml bidest. Wasser gelöst.

*D) Stammlösung 4 (2,11 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )*

5,275 g Kaliumdihydrogenphosphat (4873, Fa. Merck) wurden in 250 ml bidest. Wasser gelöst.

*E) Stammlösung 5 (3,82 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )*

9,55 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat (5886, Fa. Merck) wurden in 250 ml bidest. Wasser gelöst.

*F) Stammlösung 6 (1,30 %  $\text{NaHCO}_3$ )*

13,0 g Natriumhydrogencarbonat (6329, Fa. Merck) wurden in 1 l bidest. Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend 30 min lang mit  $\text{CO}_2$  begast.

Die Stammlösungen 1-6 (3.1.1 A-F) wurden bis zu 2 Wochen bei 4 °C gelagert.

### *G) Stammlösung 7 (6,5 % Albumin, 7,74 % HEPES, 154 mM NaOH)*

65 g Rinderserumalbumin (11930, Fa. Serva) wurden in 400 ml bidest. Wasser gelöst. 77,4 g HEPES (91053, Fa. Roth) wurden in 200 ml bidest. Wasser gelöst. Der HEPES-Lösung wurden 154 ml 1N NaOH zugefügt. Beide Lösungen wurden anschließend in einen 1 l Messkolben überführt, der mit bidest. Wasser auf 1 l aufgefüllt wurde. Die Stammlösung wurde in Portionen zu 20 ml tiefgefroren.

Der KRHA-Puffer wurde täglich frisch aus den Stammlösungen 1-7 (3.1.1 A-G) angesetzt und vor seinem Gebrauch 30 min mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast, um einen pH-Wert von 7,40 zu erreichen. Die Äquilibration geschah zur Verhütung von Schaumbildung vor Zugabe der Stammlösung 7. Nach Herstellung wurde der Puffer auf 37 °C temperiert.

Der fertige KRHA-Puffer bestand aus den folgenden Aliquoten der Stammlösungen:

200 ml Stammlösung 1	entsprechend einer Endkonzentration von	118 mM NaCl
8 ml Stammlösung 2	entsprechend einer Endkonzentration von	4,7 mM KCl
6 ml Stammlösung 3	entsprechend einer Endkonzentration von	2,5 mM CaCl <sub>2</sub>
2 ml Stammlösung 4	entsprechend einer Endkonzentration von	1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2 ml Stammlösung 5	entsprechend einer Endkonzentration von	1,2 mM MgSO <sub>4</sub>
34 ml Stammlösung 6	entsprechend einer Endkonzentration von	20,2 mM NaHCO <sub>3</sub>
8 ml Stammlösung 7	entsprechend einer Endkonzentration von	4,7 mM NaOH, 10 mM HEPES, 0,2 % Albumin

## **3.1.2 Lösungen der Testsubstanzen**

### *3.1.2.1 Glipizid-Stammlösung (0,54 mM)*

2,41 mg Glipizid wurden in 10 ml 50 mM NaOH gelöst. Die Stammlösung wurde täglich frisch hergestellt.

### *3.1.2.2 Kontrollmedien*

#### *A) 10 mM Glucose, 2,7 µM Glipizid*

198,17 mg Glucose-Monohydrat (1.08342, Fa. Merck) wurden in 99,5 ml KRHA-Puffer (3.1.1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 500 µl der Glipizid-Stammlösung (3.1.2.1) pipettiert.



*B) 10 mM Glucose, 2,7  $\mu$ M Glipizid, 10 mM Glutamin*

198,17 mg Glucose-Monohydrat (1.08342, Fa. Merck) und 146,1 mg Glutamin (G-3126, Fa. Sigma) wurden in 99,5 ml KRHA-Puffer (3.1.1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 500  $\mu$ l der Glipizid-Stammlösung (3.1.2.1) pipettiert.

*C) 40 mM Glucose, 2,7  $\mu$ M Glipizid*

792,68 mg Glucose-Monohydrat (1.08342, Fa. Merck) wurden in 99,5 ml KRHA-Puffer (3.1.1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 500  $\mu$ l der Glipizid-Stammlösung (3.1.2.1) pipettiert.

*D) 3 mM Glucose, 2,7  $\mu$ M Glipizid*

59,45 mg Glucose-Monohydrat (1.08342, Fa. Merck) wurden in 99,5 ml KRHA-Puffer (3.1.1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 500  $\mu$ l der Glipizid-Stammlösung (3.1.2.1) pipettiert.

*E) 10 mM Glucose*

198,17 mg Glucose-Monohydrat (1.08342, Fa. Merck) wurden in 100 ml KRHA-Puffer (3.1.1) gelöst.

*F) 2,7  $\mu$ M Glipizid*

Zu 99,5 ml KRHA-Puffer (3.1.1) wurden 500  $\mu$ l der Glipizid-Stammlösung (3.1.2.1) pipettiert.

*3.1.2.3 Testmedien*

Als Testsubstanzen wurden eingesetzt:

Glucose-Monohydrat (1.08342, Fa. Merck), MG 198,2

Glipizid, MG 445,5

Natrium- $\alpha$ -Ketoisocapronat (KIC) (K-0629, Fa. Sigma), MG 152,1

Natrium- $\alpha$ -Ketocapronat (KC) (K-6625, Fa. Sigma), MG 152,1

Natrium- $\alpha$ -Ketoisovalerat (KIV) (68253, Fa. Fluka), MG 138,1

Natrium- $\beta$ -Phenylpyruvat (PP) (P-8001, Fa. Sigma), MG 186,1

2-Aminobicyclo[2.2.1]heptan-2-carbonsäure (BCH, Gemisch aus 10 % ( $\pm$ )-a-BCH und 90 % ( $\pm$ )-b-BCH; CHRISTENSEN et al., 1969) (A-7902, Fa. Sigma), MG 155,2

Monomethylsuccinat (MMS) (M8, 110-1, Fa. Aldrich), MG 132,1

Die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanzen sind im Ergebnisteil angegeben. Zur Herstellung der Testmedien wurde die entsprechende Menge an Testsubstanz in 50 ml eines der im Ergebnisteil angegebenen Kontrollmedien (3.1.2.2) gelöst. Testmedien, die Natrium- $\beta$ -Phenylpyruvat enthielten, wurden nach der Herstellung filtriert (Filtropur S plus 0,2  $\mu$ m, Fa. Sarstedt). Testmedien mit Monomethylsuccinat wurden vor Versuchsbeginn mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,40 eingestellt.

### **3.1.3 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten Albinomäuse des Stammes NMRI aus einer nicht selektiven Zuchtauswahl (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln). Es wurden randomisiert männliche und weibliche Tiere im Alter von 3-6 Monaten verwendet, deren Gewicht zwischen 35 und 55 g lag. Die Mäuse wurden bei konstanter Raumtemperatur von 25 °C gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und einem Standard-Diätfutter (Altromin 1324, Fa. Altromin).

### **3.1.4 Inselisolierung**

#### *3.1.4.1 Medium für die Inselisolierung*

Die Inselisolierung wurde durchgeführt in KRHA-Puffer (3.1.1), der 5 mM Glucose enthielt. Dazu wurden 99 mg Glucose-Monohydrat (1.08342, Fa. Merck) in 100 ml KRHA-Puffer gelöst.

#### *3.1.4.2 Durchführung der Inselisolierung*

Die Pankreasinseln wurden durch Collagenase-Andauung des Pankreas isoliert (MOSKALEWSKI, 1965). Es wurde eine Modifizierung beschriebener Techniken (LACY und KOSTIANOVSKY, 1967; LERNMARK, 1974) angewendet: Sofort nach Decapitierung der Maus wurde die Bauchhöhle eröffnet, der Dick- und der Dünndarm zur Seite geklappt und die Bauchspeicheldrüse vollständig und ohne Verzögerung exzidiert. Das frisch herausgeschnittene Pankreas wurde in eine Petrischale überführt, welche 2 ml KRHA-Puffer mit 5 mM Glucose (3.1.4.1) enthielt und anschließend mit einer Schere 5 bis 8 Minuten lang in sehr feine Stücke geschnitten. Das feingeschnittene Gewebe wurde in ein Schraubdeckelgefäß, welches 1 mg Collagenase (Collagenase P, Aktivität 3,23 U/mg, Fa. Roche) enthielt, pipettiert. Das Schraubdeckelgefäß wurde in einem Schüttelwasserbad (ST1-338, Fa. Bühler) befestigt und bei einer Temperatur von 37 °C mit einer Frequenz von 328/min geschüttelt. Nach etwa 11 Minuten wurde der Verdau durch etwa 10 Sekunden langes heftiges Schütteln per Hand und anschließendes Verdünnen mit etwa 20 ml KRHA-Glucose-Puffer (3.1.4.1) unterbrochen.

Nach fünfminütiger Sedimentation des Gemisches wurde der Überstand abgesaugt, das Gefäß erneut mit KRHA-Glucose-Puffer aufgefüllt und das angedaute Gewebe in eine Petrischale überführt. Unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss) wurden die Inseln, die frei von Gewebe waren, aus dem Gewebe herauspipettiert und dreimal mit KRHA-Glucose-Puffer gewaschen. 50 freie und mikroskopisch einwandfreie Inseln wurden so für die Durchführung der Perifusion bereitgestellt.

### **3.1.5 Durchführung der Perifusion**

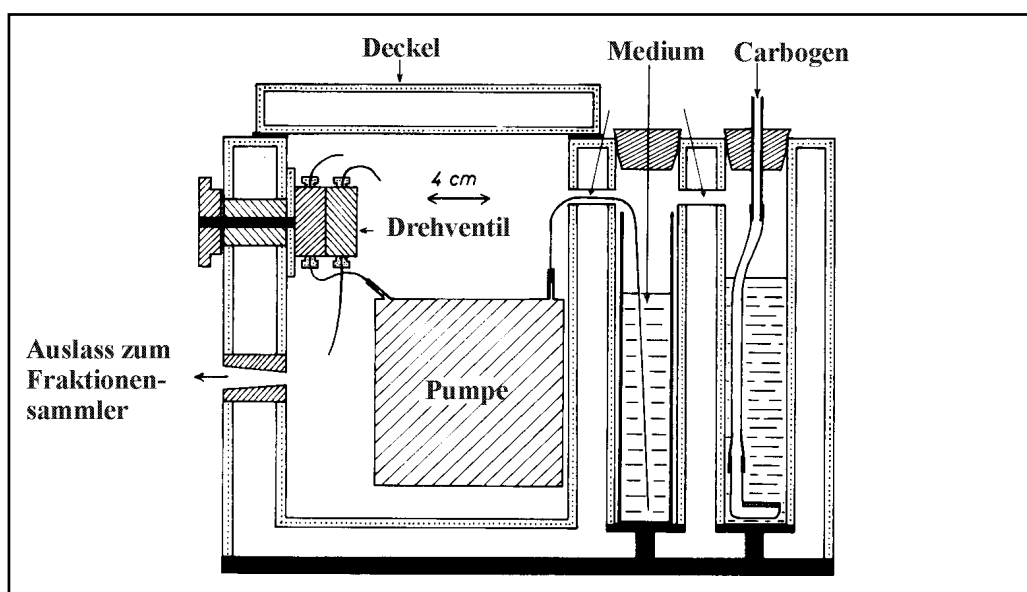
Zur Durchführung der Perifusionen wurde das 1977 von PANTEN et al. beschriebene Mikroperifusionssystem benutzt. Der Perifusionsapparat (Abb. 3.1) wurde mindestens 90 Minuten vor Beginn des Begasens mit Carbogen auf 37 °C vorgeheizt. Damit war nach dem Einbringen der Inseln in die Perifusionskammer – bei geschlossenem System – eine konstante Temperatur von 37 °C während der gesamten Versuchsdauer gewährleistet. Nach Erreichen der Temperatur von 37 °C im Perifusionssystem wurde der Apparat fortlaufend bis zum Ende des Versuchs von Carbogen durchströmt. 2 Messzylinder wurden in das Gerät hineingestellt. Messzylinder A wurde beschickt mit 100 ml KRHA-Puffer ohne Testsubstanz (Kontrollmedium, s. 3.1.2.2), Messzylinder B enthielt 50 ml KRHA-Puffer mit Testsubstanz (Testmedium, s. 3.1.2.3). Vor Versuchsbeginn wurden Kontroll- und Testmedien nochmals für 30 Minuten durch eingeführte Begasungsschläuche mit Carbogen begast.

Vor der Isolierung der Inseln wurde die Perifusionskammer vorbereitet: Mit einer Deckglaspinzette wurde ein Filter (SMWP01300, Fa. Millipore) genau in die Rille am Kammerkonus eingelegt, ohne dabei das Filter zu verletzen, ein Silikon-Dichtungsring (SX0001301, Fa. Millipore) aufgelegt und der Ableiteteil aufgeschraubt, ohne Ring oder Filter zu verschieben. Dann wurde eine 5 ml-Spritze über einen Kunststoffkonus an den Ableiteschlauch angeschlossen und die Perifusionskammer mit Hilfe der Spritze luftblasenfrei mit KRHA-Glucose-Puffer (3.1.4.1) gefüllt. 50 isolierte Inseln wurden in die vorbereitete Kammer pipettiert und sanken auf das Filter, ohne dass Luftblasen entstanden.

Nach Entfernen der Begasungsschläuche aus Kontroll- und Testmedium wurden 2 Ansaugschläuche bis auf den Boden der Zylinder eingeführt, die beiden Peristaltikpumpen (10200 Perpex; 12000 Varioperpex, Fa. LKB, Schweden) eingeschaltet und das Schlauchsystem luftblasenfrei mit Medium gefüllt. Die mit den Inseln befüllte Perifusionskammer wurde, nach Einlegen eines weiteren Dichtungsringes, durch Aufschrauben des Zuflussschlauchfittings an das Schlauchsystem angeschlossen und im Inneren des Perifusionsapparates mit Klebeband befestigt. Der Ableiteschlauch wurde nach Entfernen der 5 ml-Spritze am

Fraktionensammler (Cygnet, Fa. Isco, USA) justiert.

Nach dem Einschalten der ersten Pumpe wurden die Inseln in der Kammer vom Kontrollmedium umströmt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,9 bis 1,0 ml/min. Das Perifusat der ersten 40 Minuten wurde verworfen. Das Perifusat der folgenden 20 Minuten wurde in 5 Fraktionen à 4 Minuten gesammelt. Beim Wechsel auf die 6. Fraktion, d.h. nach 60-minütiger Perifusion wurde das Drehventil umgeschaltet, so dass die Inseln mit Testmedium perfundiert wurden. Während dieser Testphase wurden zunächst 8 Fraktionen à 1 Minute gesammelt, anschließend 9 Fraktionen à 4 Minuten. Jeweils 1 ml der insgesamt 22 Fraktionen wurde in Eppendorf-Reagiergefäßen bis zur Verwendung im ELISA-Test tiefgefroren.



**Abb. 3.1** Modell des Mikroperifusionssystems (Seitenansicht) nach PANTEN et al. (1977). Das System verfügt über doppelte Wände, die von 37 °C warmen Wasser durchströmt werden. Die Perifusionskammer (hier nicht dargestellt) wird an den vom Drehventil kommenden Schlauch angeschraubt. Für weitere Details s. Text.

### 3.1.6 Reinigung des Perifusionssystems

Nachdem die Perifusionskammer vom Schlauchsystem abgeschraubt und geöffnet worden war, wurde das Filter mit den perfundierten Inseln entfernt und alle Einzelteile mit bidest. Wasser gereinigt und danach bei 60 °C getrocknet. Das Schlauchsystem wurde 30 Minuten mit bidest. Wasser durchspült, anschließend durch ebenso langes Durchsaugen von Luft getrocknet. Einmal pro Woche bzw. vor jedem Wechsel der Testsubstanz wurde das Schlauchsystem vor der bidest.-Spülung mit Ethanol 70 % gespült. Bei Notwendigkeit wurde der Perifusionsapparat innen und außen mit Ethanol 70 % gereinigt.

### 3.1.7 Bestimmung des Insulingehaltes

Der Insulingehalt der Proben wurde mittels eines enzymatischen Immunassays (ELISA) bestimmt (Rat Insulin ELISA, Fa. Mercodia, Uppsala, Schweden). Dieser ELISA-Test funktionierte nach dem so genannten Sandwich-Prinzip: Die Mikrotiterplatte enthielt einen monoklonalen Insulinantikörper, an den das Insulin aus der Probe band. Zum Inkubationsansatz wurde ein zweiter monoklonaler Insulinantikörper gegeben, der an eine andere antigene Determinante des Insulinmoleküls band (= „Sandwich“). Dieser zweite Antikörper war mit dem Enzym Peroxidase konjugiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden (Schüttelinkubator SLT IS 2.10, Fa. SLT) wurden ungebundene Anteile des markierten Antikörpers durch Waschen entfernt. Anschließend wurde das Substrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin zum Ansatz pipettiert. Das Substrat wurde mittels Peroxidase zu einer farbigen Verbindung oxidiert. Auf diese Weise gelingt die Detektion des markierten Antikörpers bzw. des gebundenen Insulins. Die Absorption der entstandenen farbigen Verbindung wurde UV-spektroskopisch bei  $\lambda = 450$  nm bestimmt (Photometer SLT 340 ATTC, Fa. SLT) und war proportional zur Insulinkonzentration. Der Insulingehalt der Proben wurde mittels des „Easy-Fit“-Programms (Version 5.47, Fa. SLT) errechnet durch Aufstellung einer Standardkurve. Dazu wurden für jeden einzelnen Test Insulinstandards im Konzentrationsbereich von 0 bis 5,5  $\mu\text{g/l}$  parallel mit den Proben inkubiert. Proben, die mehr als 5,5  $\mu\text{g/l}$  Insulin enthielten, wurden mit Nullstandard verdünnt. Keine der eingesetzten Testsubstanzen beeinflusste die Insulinmessung.

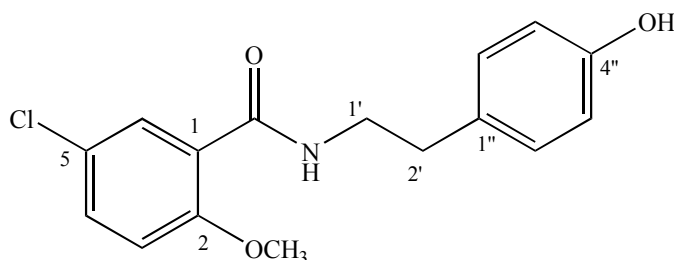
### 3.1.8 Datenauswertung

Die erhaltenen Insulinkonzentrationen mit der Einheit [ $\mu\text{g/l}$ ] wurden umgerechnet in die Einheit [ $\text{pg/min}\cdot\text{Insel}$ ]. Der Insulingehalt in der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (57. – 60. Minute) wurde als relative Sekretionsrate auf 100 % gesetzt und alle anderen ermittelten Insulinkonzentrationen auf diesen Wert bezogen.

Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetische Mittelwerte der relativen Sekretionsraten in Prozent oder als arithmetische Mittelwerte der absoluten freigesetzten Insulinmengen in  $\text{pg/min}\cdot\text{Insel} \pm \text{SEM}$  (wenn größer als das Symbol in der Abbildung) für N unabhängige Experimente in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten.

## 3.2 Synthesen

### 3.2.1 5-Chlor-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-2-methoxybenzamid



*5-Chlor-2-methoxybenzoesäurechlorid:* Zu 18,7 g (0,1 mol) 5-Chlor-2-methoxybenzoesäure (29,249-4, Fa. Aldrich) wurde unter Rühren 73 ml Thionylchlorid (23,046-4, Fa. Aldrich) gegeben, so dass eine hellgelbe Lösung entstand. Anschließend wurde eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, wobei die Anfangstemperatur 60 °C und die Endtemperatur 70-75 °C betrug. Nach 1 Stunde wurde das überschüssige Thionylchlorid bei 60 °C und 400 mbar abdestilliert. Es verblieb eine gelb-braune Lösung, die bei Raumtemperatur erstarrte.

*5-Chlor-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-2-methoxybenzamid:* 2,05 g (10 mmol) 5-Chlor-2-methoxybenzoesäurechlorid wurden in 4 ml Aceton (17,912-4, Fa. Aldrich) gelöst und unter Eiskühlung zu 1,37 g (10 mmol) Tyramin (T9,034-4, Fa. Aldrich) in einem Gemisch bestehend aus 10 ml Aceton und 14 ml 1 N NaOH getropft. Durch Zugabe von 2 N NaOH wurde der pH-Wert der Lösung alkalisch gehalten. Nach beendeter Zugabe wurde vorsichtig etwa 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur nachgerührt. Der entstandene gelbe Niederschlag wurde abfiltriert und in Ethanol/Wasser umkristallisiert. Man erhielt 2,7 g (89 %) eines hellgelben Feststoffes mit dem Schmelzpunkt 127 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 2,70 (t; J = 7,21 Hz; 2H; C2'-H<sub>2</sub>), 3,44 (sext; J = 7,11 Hz, J = 5,51 Hz; 2H; C1'-H<sub>2</sub>), 3,80 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>), 6,70 (d; J = 8,38 Hz; 2H; C2''-H, C6''-H), 7,04 (d; J = 8,36 Hz; 2H; C3''-H, C5''-H), 7,14 (d; J = 8,94 Hz; 1H; C3-H), 7,48 (dd; J = 2,74 Hz, J = 8,86 Hz; 1H; C4-H), 7,66 (d; J = 2,85 Hz; 1H; C6-H), 8,20 (t; J = 5,44 Hz; 1H; NH; Austausch mit D<sub>2</sub>O), 9,29 (s; 1H; OH; Austausch mit D<sub>2</sub>O).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  = 34,00 (C2'), 41,07 (C1'), 56,25 (OCH<sub>3</sub>), 114,18 (C3), 115,18 (C2'', C6''), 124,40 (C1 oder C5), 124,49 (C1 oder C5), 129,41 (C1''), 129,61 (C3'', C5''), 131,64 (C4), 155,65 (C2), 155,76 (C4''), 163,52 (C=O).

**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3371, 3220, 2934, 1636, 1592, 1517, 1483, 1273, 1232, 1181, 1123, 1017, 815, 674, 534.

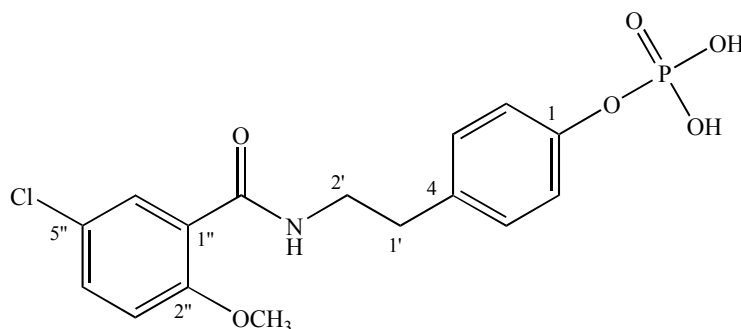
**MS**  $M/z$  (%) = 305 (12) [ $M^{+}$ ], 169 (100) [ $M^{+}-C_8H_{10}NO$ ], 120 (68) [ $C_7H_4O_2^{+}$ ], 107 (23) [ $C_7H_7O^{+}$ ], 77 (17) [ $C_6H_5^{+}$ ] (Elektronenstoß-Ionisation).

**$C_{16}H_{16}ClNO_3$  (305,76)**

Ber. C: 62,85 H: 5,27 N: 4,58

Gef. C: 62,87 H: 5,30 N: 4,28

### 3.2.2 {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat



Zu einer Suspension von 3,0 g (10 mmol) 5-Chlor-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-2-methoxybenzamid (3.2.1) in 12 ml Dichlormethan (6053.1, Fa. Roth) wurde unter Rühren 2,2 g (14,3 mmol)  $POCl_3$  (79580, Fa. Fluka) und 1,2 g (12,2 mmol) Triethylamin (47,128-3, Fa. Aldrich) in 1 ml Dichlormethan gegeben. Die Mischung wurde vorsichtig unter Rückfluss für etwa 30 Minuten zum Sieden gebracht. Anschließend wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur nachgerührt. Die Reaktionsmischung wurde 2-mal mit 10 ml Wasser gewaschen, danach wurde das Dichlormethan im Vakuum abgezogen. Der entstandene braune Feststoff wurde säulenchromatographisch gereinigt, dazu diente eine mit Kieselgel (7734, Fa. Merck) gefüllte Säule (Maße 3,5 x 40 cm). Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Chloroform/Methanol/Wasser (13/8/2) verwendet. Man erhielt als Produkt 0,85 g (22 %) glänzend weiße Kristalle mit dem Schmelzpunkt 197 °C. (Synthese modifiziert nach KING und NICHOLSON, 1939; TIETZE und EICHER, 1981)

**$^1H$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  = 1,15 (t;  $J$  = 7,26; 2H; 2 x OH, Austausch mit  $D_2O$ ), 2,79 (t;  $J$  = 7,13 Hz; 2H;  $C1'-H_2$ ), 3,52 (sext;  $J$  = 7,11 Hz,  $J$  = 5,61 Hz; 2H;  $C2'-H_2$ ), 3,80 (s; 3H;  $OCH_3$ ), 7,10 (d;  $J$  = 8,08 Hz; 2H;  $C3-H$ ,  $C5-H$ ), 7,15 (d;  $J$  = 8,94 Hz; 1H;  $C3''-H$ ), 7,23 (d,  $J$  = 8,46 Hz; 2H;  $C2-H$ ,  $C6-H$ ), 7,50 (dd;  $J$  = 2,82 Hz,  $J$  = 8,87 Hz; 1H;  $C4''-H$ ), 7,67 (d;  $J$  = 2,79 Hz; 1H;  $C6''-H$ ), 8,27 (t;  $J$  = 5,55 Hz; 1H; NH; Austausch mit  $D_2O$ ).

**$^{13}C$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  = 34,30 ( $C1'$ ), 41,06 ( $C2'$ ), 56,52 ( $OCH_3$ ), 114,43 ( $C3''$ ), 120,28 ( $C3$ ,  $C5$ ), 124,64 ( $C1''$  oder  $C5''$ ), 124,65 ( $C1''$  oder  $C5''$ ), 129,84 ( $C6''$ ), 129,90

(C2, C6), 131,96 (C4''), 135,02 (C4), 150,27 (C1), 156,01 (C2''), 163,92 (C=O).

**<sup>31</sup>P-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 81 MHz):  $\delta$  = -5,15 (P).

**IR** (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3376, 2959, 2847, 2737-2672 (breit), 2298, 1621, 1590, 1545, 1510, 1482, 1225, 1035, 992, 804, 645, 533.

**MS** M/z (%) = 384 (19) [(M-H)<sup>-</sup>], 386 (2) [(M+H)<sup>+</sup>] (Fast Atom Bombardment, Matrix: 2-Nitrobenzylalkohol).

**C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>ClNO<sub>6</sub>P (385,74)**

Ber. C: 49,82 H: 4,44 N: 3,63

Gef. C: 49,85 H: 4,41 N: 3,47

### 3.2.3 Verwendete Geräte

*Schmelzpunkte:* Schmelzpunkte wurden mit einem Linströmgerät (SPA-1, Fa. Bühler) bestimmt und sind nicht korrigiert.

*IR-Spektren:* Die IR-Spektren wurden mit dem Gerät ATI Mattsson Genesis Series FTIR™ Rev. I (Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig) aufgenommen.

*<sup>1</sup>H-NMR-Spektren:* Zur Aufnahme von Protonenresonanzspektren wurde das Gerät Bruker DRX 400 (400,13 MHz, NMR-Laboratorium der Chemischen Institute der TU Braunschweig) verwendet. Die chemischen Verschiebungen sind in [ppm]-Einheiten der  $\delta$ -Skala angegeben. Als interner Standard diente DMSO-d<sub>6</sub> ( $\delta$  = 2,49) (29,614-7, Fa. Aldrich). Zur Kennzeichnung der Multiplizität der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet und sext = Sextett. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz [Hz] angegeben. OH- und NH-Protonen wurden durch H/D-Austausch mit D<sub>2</sub>O nachgewiesen.

*<sup>13</sup>C-NMR-Spektren:* Die Aufnahme der <sup>13</sup>C-Spektren erfolgte mit dem Spektrometer Bruker DRX400 (100,61 MHz, NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig). Die chemischen Verschiebungen sind in [ppm]-Einheiten der  $\delta$ -Skala angegeben. Als interner Standard diente DMSO-d<sub>6</sub> ( $\delta$  = 39,7) (29,614-7, Fa. Aldrich). Die Multiplizitäten der <sup>13</sup>C-Signale wurden durch DEPT-Messungen belegt.

*<sup>31</sup>P-NMR-Spektren:* Die Aufnahme der <sup>31</sup>P-Spektren erfolgte mit dem Spektrometer Bruker DRX 400 (81 MHz, NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig). Die chemischen Verschiebungen sind in [ppm]-Einheiten der  $\delta$ -Skala angegeben.

*Massenspektren:* Die Massenspektren wurden mit dem Spektrometer Finnigan MAT 8400 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig) aufgenommen.

*Elementaranalysen:* Elementaranalysen wurden mit dem Modell C-H-N-O Elementar Analyzer 1106 Carlo Erba (Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig) durchgeführt.



### **3.3 Zellkultur und Transfektion von COS1-Zellen sowie Membranpräparation**

#### **3.3.1 Kultivierung, Passagierung und Kryokonservierung von COS1-Zellen**

##### *3.3.1.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur*

###### *A) Penicillin/Streptomycin–Stammlösung (20.000 IE/ml bzw. 20.000 µg/ml)*

1,2 g Penicillin G–Natrium (A 321–42, Fa. Biochrom) und 2,0 g Streptomycinsulfat (A 331–26, Fa. Biochrom) wurden in 100 ml 0,9 % Natriumchlorid–Lösung gelöst und bei -20 °C gelagert.

###### *B) Dulbecco Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) + 10 % FCS*

13,5 g DMEM–Trockenmedium (T 043–10, Fa. Biochrom) sowie 2,2 g Natriumhydrogencarbonat (p.a., 6329, Fa. Merck; Endkonzentration 26 mM) wurden in ca. 800 ml bidest. Wasser gelöst. 5 ml der Penicillin/Streptomycin–Stammlösung (Endkonzentration 100 IE/ml bzw. 100 µg/ml) wurden dazugegeben und die Lösung mit 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf pH 7,15 eingestellt. Das Volumen wurde mit bidest. Wasser auf 1000 ml abgeglichen. Die Lösung wurde anschließend unter Verwendung eines Edelstahl–Vakuum–Filtrationsgeräts (SM 16268 107500, Fa. Sartorius) mit Vorfilter (13400–130 K, Fa. Sartorius) und Hauptfilter (0,2 µm; 11307–142, Fa. Sartorius) sterilfiltriert. Das Medium wurde bei 4 °C bis zu 8 Wochen gelagert. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden 100 ml fötales Kälberserum (FCS; sterilfiltriert, Fa. Kraeber; 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert) zugegeben und das fertige Medium im Wasserbad auf 37 °C gebracht.

###### *C) Einfriermedium (DMEM + 20 % FCS)*

Unter der Reinraumwerkbank wurden 12 ml DMEM (+ NaHCO<sub>3</sub> und Penicillin/Streptomycin, 3.3.1.1 B) mit 3 ml FCS versetzt.

###### *D) DMSO–Lösung (Einfriermedium + 10 % DMSO)*

Unter der Reinraumwerkbank wurden 13,5 ml Einfriermedium (3.3.1.1 C) mit 1,5 ml autoklaviertem DMSO (p.a., 1.02952, Fa. Merck) versetzt.

###### *E) Trypsin/EDTA–Lösung*

100 ml Trypsin/EDTA–Lösung (0,5 %/0,2 % in PBS (10x) ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>; L–2153, Fa. Biochrom) wurden unter einer Reinraumwerkbank mit 900 ml sterilem bidest. Wasser vermischt, in Röhrchen à 50 ml (Fa. Sarstedt) abgefüllt und bei -20 °C gelagert.

*F) Phosphatpuffer (CMF–PBS)*

8,0 g Natriumchlorid (p.a., 1.06404, Fa. Merck), 0,2 g Kaliumchlorid (p.a., 1.04936, Fa. Merck), 1,15 g wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat (p.a., 1.06586, Fa. Merck) und 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (p.a., 4873, Fa. Merck) wurden in 900 ml bidest. Wasser gelöst, die Lösung mit 1 N NaOH oder 1 N HCl auf pH 7,3 abgeglichen und ad 1000 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt. Die fertige Lösung wurde in Aliquoten autoklaviert.

*3.3.1.2 Kultivierung von COSI–Zellen*

COSI–Zellen (CV–1, Origin of SV40; GLUZMAN, 1981) sind Derivate einer mit SV40–Viren (Simian Virus) infizierten permanenten Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (CV–1). Die als Monolayer wachsenden Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM–Medium mit 10 % FCS (3.3.1.1 B) kultiviert und im Abstand von 3 – 4 Tagen passagiert.

*3.3.1.3 Umsetzen der Zellen (Passagieren)*

Nach Absaugen des Kulturmediums aus den Petrischalen wurden die Zellen vorsichtig je zweimal mit 8 ml CMF–PBS (3.3.1.1 F) gespült. Jeweils 3 ml Trypsin/EDTA–Lösung (3.3.1.1 E) wurden zugesetzt und die Petrischalen zwei bis fünf Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Das Abdauen der Zellen wurde durch Zugabe von 6 ml frischem Kulturmedium (DMEM+10 % FCS, 3.3.1.1 B) gestoppt. Durch leichtes Aufklopfen der Petrischalen auf die Arbeitsfläche wurden die letzten noch am Boden haftenden Zellen abgelöst. Die Zellsuspension aus jeweils einer Petrischale wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt) überführt und durch Zentrifugation (5 min bei 100 g und 4 °C, Heraeus Megafuge 1.0R, Rotor 2705, 900 Upm) sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes und Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellsedimente in jeweils 10 ml Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1 : 3 bis 1 : 5 so auf frische Petrischalen verteilt, dass sich ca. 500.000 Zellen pro Schale ergaben.

*3.3.1.4 Kryokonservierung von COSI–Zellen*

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen einer dicht bewachsenen Kulturschale wie unter 3.3.1.3 beschrieben abgedaut und sedimentiert. Anschließend wurden sie in 1,5 ml vorgekühltem Einfriermedium (4 °C, 3.3.1.1 C) resuspendiert und mit 1,5 ml 10 %iger DMSO–Lösung (4 °C, 3.3.1.1 D) versetzt. Je 1,5 ml dieser Suspension wurden in ein autoklaviertes Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden in eine mit 100 % Isopropanol (p.a., 59301, Fa.

Fluka) gefüllte Einfrierbox (Mr. Frosty, NA5100–0001, Fa. Nunc) gestellt und nach einer Equilibrierungszeit von ca. 30 min für mindestens 4 Stunden bei -70 °C gelagert. Anschließend wurden sie tiefgefroren in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt.

### **3.3.2 Transformation und Plasmidpräparation**

#### *3.3.2.1 Lösungen für die Transformation und Plasmidpräparation*

##### *A) Glucoselösung (1 M, steril)*

19,82 g Glucose-Monohydrat (1.08342, Fa. Merck) wurden in 90 ml bidest. Wasser gelöst, auf 100 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt und anschließend sterilfiltriert. Die Sterilfiltration erfolgte unter Verwendung des Spritzenvorsatzes Filtropur S 0,2 (Porengröße 0,2 µm, 83.1826.001, Fa. Sarstedt).

##### *B) Kaliumchlorid-Stammlösung (0,25 M)*

1,86 g Kaliumchlorid (p.a., 4936, Fa. Merck) wurden in 100 ml bidest. Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 1 N KOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert.

##### *C) Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)*

10 g Select Pepton 140 (30392–021, Fa. Gibco), 5 g Hefeextrakt (30393–029, Fa. Gibco) und 10 g Natriumchlorid (p.a., 1.06404, Fa. Merck) wurden in 950 ml bidest. Wasser gelöst, die Lösung mit 5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt, ad 1000 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

##### *D) SOB-Medium*

20 g Select Pepton 140 (30392–021, Fa. Gibco), 5 g Hefeextrakt (30393–029, Fa. Gibco) und 0,5 g Natriumchlorid (p.a., 1.06404, Fa. Merck) wurden in 950 ml bidest. Wasser gelöst, 10 ml 0,25 M Kaliumchlorid-Lösung (3.3.2.1 B) zugesetzt, die Lösung mit 5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt, ad 1000 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

##### *E) SOC-Medium*

SOB-Medium (3.3.2.1 D) wurde nach dem Autoklavieren auf ca. 60 °C abgekühlt. Unter der Reinraumwerkbank wurden 2 ml einer 1 M sterilen Glucoselösung (3.3.2.1 A) zu 100 ml SOB-Medium gegeben.

*F) Ampicillin–Stammlösung (50 mg/ml)*

1 g Ampicillin (835 242, Fa. Roche) wurde in 20 ml bidest. Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei –20 °C vor Licht geschützt gelagert. Die Sterilfiltration erfolgte unter Verwendung eines Spritzenvorsatzes wie unter 3.3.2.1 A beschrieben.

*G) LB–Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin*

15 g Agar–Agar (5210.1, Fa. Roth) wurden zu 1 l LB–Medium (3.3.2.1 C) gegeben und das Medium anschließend autoklaviert. Nachdem das Medium auf ca. 50 °C abgekühlt war, wurden 2 ml der Ampicillin–Stammlösung (3.3.2.1 F) zugesetzt und die Platten unter der Reinraumwerkbank gegossen (ca. 30 ml pro 94 mm Petrischale). Die Platten wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

*H) Medium A zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien*

0,493 g Magnesiumsulfat (p.a., 5886, Fa. Merck) und 0,4 g Glucose–Monohydrat (1.08342, Fa. Merck) wurden in 200 ml LB–Medium (3.3.2.1 C) gelöst und die Lösung anschließend unter Verwendung eines Spritzenvorsatzes wie unter 3.3.2.1 A beschrieben sterilfiltriert.

*I) Medium B zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien*

36 ml Glycerin (wasserfrei, reinst; 4093, Fa. Merck), 12 g Polyethylenglycol 8.000 (P–2139, Fa. Sigma) und 0,296 g Magnesiumsulfat (p.a., 5886, Fa. Merck) wurden in 100 ml LB–Medium (3.3.2.1 C) gelöst und die Lösung anschließend durch einen Spritzenvorsatz (s. 3.3.2.1 A) sterilfiltriert.

*J) Resuspensionspuffer für die Plasmidpräparation*

6,066 g Tris (100 840, Fa. Paesel + Lorei) und 3,722 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; 1.08418, Fa. Merck) wurden in 800 ml sterilem bidest. Wasser gelöst, der pH–Wert mit 1 N HCl auf pH 8,0 eingestellt und ad 1000 ml mit sterilem bidest. Wasser aufgefüllt. In 100 ml dieser Lösung wurden 10 mg RNase A (19101, Fa. Qiagen) gelöst. Der Resuspensionspuffer konnte 6 Monate bei 4 °C gelagert werden.

*K) Lysispuffer für die Plasmidpräparation*

8 g NaOH (6462, Fa. Merck) und 10 g Natriumdodecylsulfat (Spezialqualität, Nr. 1028 693, Fa. Roche) wurden in 1000 ml sterilem bidest. Wasser gelöst.

*L) Neutralisationspuffer für die Plasmidpräparation*

294,42 g Kaliumacetat (für die Molekularbiologie, 1.04830, Fa. Merck) wurden in 500 ml sterilem bidest. Wasser gelöst, der pH-Wert mit Eisessig auf 5,5 abgeglichen und mit sterilem bidest. Wasser ad 1000 ml aufgefüllt.

*M) Equilibrierpuffer für die Plasmidpräparation*

43,83 g Natriumchlorid (1.06404, Fa. Merck) und 10,46 g 4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS; 6979.2, Fa. Roth) wurden in 700 ml sterilem bidest. Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,0 eingestellt. Nach Zugabe von 156,25 ml technischem Ethanol und 1,5 ml Triton X-100 (789 704, Fa. Roche) wurde mit sterilem bidest. Wasser ad 1000 ml aufgefüllt.

*N) Waschpuffer für die Plasmidpräparation*

58,44 g Natriumchlorid (1.06404, Fa. Merck) und 20,92 g 4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS; 6979.2, Fa. Roth) wurden in 1500 ml sterilem bidest. Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,0 eingestellt. Nach Zugabe von 312,5 ml technischem Ethanol wurde mit sterilem bidest. Wasser ad 2000 ml aufgefüllt.

*O) Elutionspuffer für die Plasmidpräparation*

73,05 g Natriumchlorid (1.06404, Fa. Merck) und 6,066 g Tris (100 840, Fa. Paesel + Lorei) wurden in 800 ml sterilem bidest. Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 N HCl auf 8,5 eingestellt. Nach Zugabe von 156,25 ml technischem Ethanol wurde mit sterilem bidest. Wasser ad 1000 ml aufgefüllt.

*P) Tris/EDTA-Puffer*

1,21 g Tris (100 840, Fa. Paesel + Lorei) und 372,2 mg EDTA (1.08418, Fa. Merck) wurden in 800 ml bidest. Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1 N HCl auf 8,0 eingestellt und mit bidest. Wasser ad 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer in Portionen zu 100 ml aliquotiert und autoklaviert.

*3.3.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien*

Die Herstellung transformationskompetenter Zellen erfolgte unter Verwendung von Polyethylenglykol (PEG-Methode). 5 ml LB-Medium (3.3.2.1 C) wurden mit E. coli-Zellen (Epicurian Coli XL1-Blue) beimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (Innova 4300,

Fa. New Brunswick Scientific) kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 50 ml Medium A (3.3.2.1 H) mit 500 µl der Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert bis die optische Dichte bei  $\lambda = 578 \text{ nm}$  0,55 betrug (Spektralphotometer Uvikon 932, Fa. Kontron Instruments). Anschließend wurde die Bakteriensuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4 °C und 1500 g zentrifugiert (Kühlzentrifuge GR 2022 mit Rotor AG 290.9, Fa. Jouan; 2900 Upm). Das Sediment wurde in 500 µl eiskaltem Medium A (3.3.2.1 H) resuspendiert. Nach Zusatz von 2,5 ml Medium B (3.3.2.1 I) wurde vorsichtig gemischt und die Bakteriensuspension à 100 µl aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden bei –70 °C eingefroren und bis zu einem Jahr gelagert.

### *3.3.2.3 Durchführung der Transformation*

100 µl kompetente Zellen (s. 3.3.2.2) wurden in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 2 µl der Plasmid–DNA–Lösung (50 µg/ml) wurde der Ansatz vorsichtig geschwenkt und zunächst 30 min in ein Eisbad gestellt. Anschließend wurde die Lösung in einem Wasserbad exakt 90 s bei 42 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz sofort 1 bis 2 min im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl SOC–Medium (3.3.2.1 E) wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad gehalten. Anschließend wurde die Lösung auf eine LB–Agarplatte (3.3.2.1 G) ausgestrichen. Die Platten wurden einige Stunden bei Raumtemperatur unter der Reinraumwerkbank stehen gelassen und dann über Nacht bei 37 °C inkubiert (Begasungsbrutschrank BB6220, Fa. Heraeus Instruments). Am nächsten Tag wurde eine der über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien in 10 ml LB–Medium (3.3.2.1 C) überführt, dem zuvor 20 µl Ampicillin–Stammlösung (3.3.2.1 F) zugesetzt worden waren. Diese Bakteriensuspension wurde über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert.

### *3.3.2.4 Plasmidpräparation*

Am folgenden Tag wurden die Bakterien abzentrifugiert (Jouan Kühlzentrifuge GR 2022, Rotor AG 100.18, 6000 g, 4 °C, 15 min). Das Pellet wurde in 4 ml Resuspensionspuffer (3.3.2.1 J) resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Lysisbuffer (3.3.2.1 K) wurde vorsichtig durchgemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 ml Neutralisationspuffer (3.3.2.1 L) zugesetzt, sofort vorsichtig vermischt und die Suspension 15 min unter Eiskühlung inkubiert. Nach Zentrifugation des Bakterienlysats (Jouan Kühlzentrifuge GR 2022, Rotor AG 16.20, 30.000 g, 4 °C, 30 min) wurde sofort der Überstand abgenommen und auf eine zuvor mit 4 ml Equilibrierpuffer (3.3.2.1 M) equilibrierte Säule (Qiagen–tip20, 10023, Fa. Qiagen) aufgegeben. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 10 ml Waschpuf-

fer (3.3.2.1 N) gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml Elutionspuffer (3.3.2.1 O) in ein steriles Gefäß eluiert. Nachdem die DNA mit 3,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und abzentrifugiert wurde (Jouan Kühlzentrifuge GR 2022, Rotor AG 16.20, 25.000 g, 4  C, 30 min), wurde das DNA-Präzipitat zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und bis zu einer Endkonzentration von 1  g/Öl in sterilem Tris/EDTA-Puffer (3.3.2.1 P) gelöst.

### 3.3.3 Transfektion

#### 3.3.3.1 Lösungen

##### A) Diethylaminoethyl-Dextran-Stammlösung (50 mg/ml)

500 mg Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran, D-9885, Fa. Sigma) wurden in 10 ml bidest. Wasser gelöst und autoklaviert.

##### B) TBS-Puffer (Tris Buffered Saline)

Lösung A: 80 g Natriumchlorid (p.a., 1.06404, Fa. Merck), 3,8 g Kaliumchlorid (p.a., 4936, Fa. Merck), 2,0 g wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat (p.a., 1.06586, Fa. Merck) und 30 g Tris (100 840, Fa. Paesel + Lorei) wurden in 900 ml bidest. Wasser gelöst, mit 1 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit bidest. Wasser ad 1 l aufgefüllt.

Lösung B: 1,5 g Calciumchlorid (2382, Fa. Merck) und 1,0 g Magnesiumchlorid (5833, Fa. Merck) wurden in 100 ml bidest. Wasser gelöst.

Beide Lösungen wurden bei 4  C gelagert.

Zur Herstellung des TBS-Puffers wurden 100 ml Lösung A mit 890 ml bidest. Wasser vermischt und anschließend 10 ml Lösung B tropfenweise unter Rühren zugegeben. Die Lösung wurde wie unter 3.3.1.1 B beschrieben sterilfiltriert und bei 4  C aufbewahrt.

##### C) HBSS-Puffer (Hepes Buffered Saline Solution)

8 g Natriumchlorid (p.a., 1.06404, Fa. Merck), 0,37 g Kaliumchlorid (p.a., 4936, Fa. Merck), 107,7 mg wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat (p.a., 1.06586, Fa. Merck) und 5 g HEPES (242 608, Fa. Roche) wurden in 900 ml bidest. Wasser gelöst, mit 1 N NaOH auf pH 7,05 eingestellt und mit bidest. Wasser ad 1 l aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung wie unter 3.3.1.1 B beschrieben sterilfiltriert und bei 4  C gelagert.

*D) 10 % FCS in TBS*

3,6 ml TBS (3.3.3.1 B) wurden mit 0,4 ml sterilfiltriertem fötalem Kälberserum unter der Reinraumwerkbank gemischt. Die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt.

*E) 10 % DMSO in HBSS*

Pro Platte wurden 4,5 ml HBSS (3.3.3.1 C) mit 0,5 ml autoklaviertem DMSO (p.a., 1.02952, Fa. Merck) unter der Reinraumwerkbank gemischt. Die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt.

*F) Trispuffer pH 7,4 (1 M)*

36,3 g Tris (100 840, Fa. Paesel + Lorei) wurden in 200 ml bidest. Wasser gelöst, mit HCl 37 % auf pH 7,4 eingestellt, mit bidest. Wasser ad 300 ml aufgefüllt und autoklaviert.

*G) Natriumchlorid-Lösung (5 M)*

2,92 g Natriumchlorid (p.a., 1.06404, Fa. Merck) wurden in 10 ml bidest. Wasser gelöst und die Lösung anschließend autoklaviert.

*H) Chloroquin-Stammlösung*

51,6 mg Chloroquin (C-6628, Fa. Sigma) wurden in 9,22 ml bidest. Wasser gelöst und mit 0,5 ml 1 M Trispuffer (3.3.3.1 F) pH 7,4 und 0,28 ml 5 M Natriumchlorid-Lösung (3.3.3.1. G) vermischt. Anschließend wurde diese Lösung wie unter 3.3.1.1 B beschrieben sterilfiltriert und in Aliquoten bei -20 °C und vor Licht geschützt gelagert.

*I) DMEM ohne FCS*

Die unter 3.3.1.1 B beschriebene Lösung wurde ohne FCS-Zusatz weiter verwendet.

*J) DMEM/100 µM Chloroquin/ 2 % FCS-Medium*

Pro Platte wurden 200 µl FCS, 100 µl Chloroquin-Stammlösung (3.3.3.1 H) und 9,7 ml DMEM-Medium ohne FCS (3.3.3.1 I) gemischt. Die Lösung wurde jeweils unter der Reinraumwerkbank frisch hergestellt.



### 3.3.3.2 Transfektion mittels DEAE–Dextran–Methode

Die transiente Transfektion der COS1–Zellen (3.3.1.2) wurde mit einer modifizierten DEAE–Dextran–Methode durchgeführt. 24 Stunden vor der Transfektion wurden 500.000 COS–Zellen für die Bindungsexperimente bzw. 200.000 COS–Zellen für Patch–Clamp–Experimente in 94 mm–Petrischalen in Kulturmedium (3.3.1.1 B) ausgesät. Am folgenden Tag wurde die Transfektion wie folgt durchgeführt: Für Bindungsexperimente wurden 20 µg SUR–Plasmid ad 60 µl mit TBS (3.3.3.1 B) ergänzt, für Patch–Clamp–Experimente wurden 20 µg SUR–Plasmid mit 20 µg K<sub>IR</sub>6.2–Plasmid gemischt und mit TBS (3.3.3.1 B) ad 60 µl ergänzt. Dem Gemisch wurde DEAE–Dextran (3.3.3.1 A, 83,6 µl ad 120 µl TBS) zugesetzt, die Ansätze wurden sorgfältig gemischt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde die unter 3.3.3.1 D beschriebene FCS/TBS–Lösung hergestellt und die Zellen zweimal mit je 8 ml HBSS (3.3.3.1 C) gewaschen. Dann wurde das DNA/DEAE–Dextran–Gemisch mit 4 ml der frisch hergestellten FCS–Lösung in TBS verdünnt, vorsichtig durchmischt und auf die gewaschenen Zellen pipettiert. Danach wurden die Platten vier Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (Begasungsbrutschrank BB6220, Fa. Heraeus Instruments) inkubiert. Während dieser Zeit wurden die DMSO–Lösung in HBSS (3.3.3.1 E) und das Chloroquin–Medium (3.3.3.1 H) angesetzt. Das Chloroquin–Medium wurde vor Licht geschützt und beide Lösungen auf 37 °C vortemperierte. Anschließend wurde die DNA/DEAE–Dextran–Lösung abgesaugt und die vortemperierte DMSO–Lösung (5 ml, 3.3.3.1 E) auf die Zellen pipettiert. Nach genau zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgesaugt und das Chloroquin–Medium zugesetzt. Die Platten wurden dann vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 8 ml HBSS (3.3.3.1 C) gewaschen und 12 ml Kulturmedium (3.3.1.1 B) zugesetzt. Nach 48 – 72 Stunden konnten die Zellen für Patch–Clamp–Experimente verwendet werden. Die Transfektion der COS1–Zellen für die Bindungsexperimente (s. 3.4) erfolgte in der gleichen Weise. Die Herstellung der Membranpräparationen (s. 3.3.4.2) erfolgte dann nach 72 Stunden.

### 3.3.3.3 Histologische Lac Z–Färbung

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz diente die histologische Lac Z–Färbung. Bei jeder Transfektion wurde eine Petrischale mit β–Galactosidase–Plasmid transfiziert. Dieses Enzym setzt die farblose Verbindung X–Gal (5–Brom–4–chlor–3–indoxyl–β–D–galactosid) zu einem blauen Farbstoff um.

### *3.3.3.3.1 Lösungen für die histologische Lac Z-Färbung*

#### *A) X-Gal (10 mg/ml)*

500 mg X-Gal (2315.3, Fa. Roth) wurden unter dem Abzug in 50 ml Dimethylformamid (z. Synthese, 625.1, Fa. Roth) gelöst und bei -20 °C dunkel gelagert.

#### *B) Magnesiumchlorid (2 M)*

40,66 g Magnesiumchlorid (p.a., 1.05833, Fa. Merck, MG 203,31) wurden ad 100 ml in bidest. Wasser gelöst.

#### *C) Kaliumferrocyanat (0,5 M)*

1056 mg Kaliumferrocyanat (P-9387, Fa. Sigma, MG 422,4) wurden ad 5 ml in bidest. Wasser gelöst und bei 4 °C dunkel gelagert.

#### *D) Kaliumferricyanat (0,5 M)*

823 mg Kaliumferricyanat (P-8131, Fa. Sigma, MG 329,2) wurden ad 5 ml in bidest. Wasser gelöst und bei 4 °C dunkel gelagert.

#### *E) 0,2 % Triton X-100 in CMF-PBS*

200 µl Triton X-100 (789 704, Fa. Roche) wurden ad 100 ml in CMF-PBS (3.3.1.1 F) gelöst.

#### *F) 3 % Paraformaldehyd in CMF-PBS*

10 ml CMF-PBS (3.3.1.1 F, 10x; L-2153, Fa. Biochrom) wurden in 800 ml bidest. Wasser gegeben und der Ansatz auf 60 °C erwärmt. 3 g Paraformaldehyd (1.04005, Fa. Merck) wurden unter dem Abzug abgewogen und dem Ansatz zugefügt, der pH mit 10 N NaOH auf 7,4 eingestellt und der Ansatz unter dem Abzug bis zur Lösung gerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und in Aliquoten bei -20 °C eingefroren.

#### *G) Färbelösung*

Die Färbelösung wurde immer frisch angesetzt. 100 µl Kaliumferrocyanat (3.3.3.3.1 C), 100 µl Kaliumferricyanat (3.3.3.3.1 D), 1 ml X-Gal (3.3.3.3.1 A) und 10 µl 2 M MgCl<sub>2</sub> (3.3.3.3.1 B) wurden ad 10 ml in bidest. Wasser gelöst.

### 3.3.3.3.2 Färbung

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit CMF–PBS (3.3.1.1 F) gewaschen und mit 5 ml 3 % Paraformaldehyd in CMF–PBS (3.3.3.3.1 F) versehen. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut zweimal mit CMF–PBS (3.3.1.1 F) gewaschen. Dann wurden 5 ml 0,2 % Triton X–100 in CMF–PBS (3.3.3.3.1 E) auf die Zellen gegeben und alles 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit CMF–PBS (3.3.1.1 F) gewaschen und die Färbelösung (3.3.3.3.1 G) zugegeben. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C in der Dunkelheit wurden die Zellen zweimal mit CMF–PBS (3.3.1.1 F) gewaschen und das Resultat ausgewertet.

### 3.3.3.3.3 Auswertung der Färbung

Die Auswertung der Färbung erfolgte unter dem Mikroskop. Transfizierte Zellen erscheinen nach der Färbung blau. Die Transfektionseffizienz wurde ermittelt als der Anteil der blau gefärbten Zellen an der gesamten Zellmenge.

## 3.3.4 Membranpräparation

### 3.3.4.1 Lösungen für die Membranpräparation

*A) Phosphat–Spülpuffer (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,7 mM)*

12 g Natriumchlorid (p.a., 1.06404, Fa. Merck), 300 mg Kaliumchlorid (p.a., 4936, Fa. Merck), 1,725 g wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat (p.a., 1.06586, Fa. Merck), 150 mg Magnesiumchlorid (5833, Fa. Merck) und 150 mg Calciumchlorid (2382, Fa. Merck) wurden in 1 l bidest. Wasser gelöst. Der pH–Wert wurde mit 1 N HCl auf 7,4 eingestellt und das Volumen mit bidest. Wasser ad 1,5 l aufgefüllt.

*B) Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF 100 mM)*

Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden 8,71 mg PMSF (P–7626, Fa. Sigma) in 500 µl 99,9 % Ethanol gelöst.

*C) Lysemedium (Tris 5 mM, PMSF 0,1 mM, pH 8,0)*

60,5 mg Tris (100 840, Fa. Paesel + Lorei) wurden in 90 ml bidest. Wasser gelöst. 100 µl 100 mM PMSF–Lösung (3.3.4.1 B) wurden hinzugegeben und der pH–Wert mit 1 N HCl auf 8,0 eingestellt. Das Volumen wurde mit bidest. Wasser ad 100 ml aufgefüllt.

*D) Homogenisationsmedium (Tris 50 mM, PMSF 0,1 mM, pH 7,4)*

303 mg Tris (100 840, Fa. Paesel + Lorei) wurden in 40 ml bidest. Wasser gelöst. 50 µl 100 mM PMSF-Lösung (3.3.4.1 B) wurden hinzugegeben und der pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,4 eingestellt. Das Volumen wurde mit bidest. Wasser ad 50 ml aufgefüllt.

*E) Trispuffer (5 mM)*

60,5 mg Tris (100 840, Fa. Paesel + Lorei) wurden in 90 ml bidest. Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,4 eingestellt. Das Volumen wurde mit bidest. Wasser ad 100 ml aufgefüllt.

*3.3.4.2 Präparation von Membranen aus COSI-Zellen*

72 Stunden nach der Transfektion (3.3.3.2) wurde das Kulturmedium aus den Kulturschalen entfernt und der Zellrasen mit 5 ml Phosphat-Spülpuffer (3.3.4.1 A) gespült. Anschließend wurden die Zellen nach Zusatz von 3 ml Phosphat-Spülpuffer (3.3.4.1 A) mit einem Gummischaber vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in Spitzbodenröhrchen überführt und die Kulturschalen wurden zweimal mit 2 ml Spülpuffer nachgespült. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 100 g sedimentiert (4 °C, Heraeus Megafuge 1.0R, Rotor 2705, 900 Upm). Die sedimentierten Zellen wurden in jeweils 500 µl kaltem Lysemedium (4 °C, 3.3.4.1 C) resuspendiert, in einen 1 ml-Glashomogenisator (Nr. 19, Kontes Glass Co, Fa. Vineland, NJ, USA) überführt und auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, um die Zellen in dem hypotonen Medium platzen zu lassen. Anschließend wurde die Suspension unter Eiskühlung mit 40 Hüben (Teflonpistill) bei 500 Upm mechanisch homogenisiert. Zur Sedimentation der Zellfragmente wurde dieses Homogenat 30 min bei 4 °C und 38.000 g zentrifugiert (Kühlzentrifuge GR 2022, Rotor 2.20, Fa. Jouan). Das Sediment wurde in je 100 µl kaltem Homogenisationspuffer (3.3.4.1 D) resuspendiert, unter Verwendung eines Glashomogenisators rehomogenisiert und erneut sedimentiert (1 h, 38.000 g, wie oben). Dieses zweite Sediment („Membranen“) wurde in jeweils 60 µl kaltem 5 mM Trispuffer (3.3.4.1 E) resuspendiert. Nach Rehomogenisation mit dem Glashomogenisator (s.o.) wurde die Suspension in vorgekühlte Kryoröhrchen (Fa. Roth) aliquotiert und bei -196 °C aufbewahrt.

### 3.3.5 Proteinbestimmung

(abgewandelt nach Sigma, Methode No. TPRO–562)

#### 3.3.5.1 Lösungen für die Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurden folgende Lösungen verwendet:

<i>Reagenz A:</i>	Bicinchoninic acid–Lösung (B–9643, Fa. Sigma)
<i>Reagenz B:</i>	4 % (w/v) Kupfer–II–sulfatpentahydrat (p.a., 2790, Fa. Merck)
<i>Lösung A:</i>	5 ml Reagenz A und 0,1 ml Reagenz B gut vermischen
<i>Proteinstandard:</i>	1 mg/ml Bovines Serum Albumin (11924, Fa. Serva)

#### 3.3.5.2 Durchführung der Proteinbestimmung

Für die Eichreihe wurde der Proteinstandard (3.3.5.1) so verdünnt, dass die Lösungen 0, 200, 400, 600, 800 und 1000 µg BSA/ml enthielten. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte in einer Mikrotiterplatte (82.1581, Fa. Sarstedt). Pro Inkubationsansatz wurden zu 200 µl Lösung A (3.3.5.1) 10 µl verdünnte Proteinstandardlösung bzw. Probelösung gegeben und 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert (Inkubator SLT IS 2.10, Fa. SLT). Anschließend wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und die Absorption bei  $\lambda = 550$  nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (SLT 340 ATTC, Fa. SLT) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des „Easy–Fit“-Programms (Version 5.47, Fa. SLT).

## 3.4 Bindungsexperimente an Membranen von COS1-Zellen

### 3.4.1 Lösungen für die Bindungsexperimente

#### *A) Standardpuffer A (Tris–HCl 200 mM)*

24,23 g Tris (100 840, Fa. Paesel + Lorei) wurden in 900 ml bidest. Wasser gelöst. Der pH – Wert wurde mit HCl 37 % auf 7,40 eingestellt. Das Volumen wurde mit bidest. Wasser ad 1 l aufgefüllt. Der Puffer wurde bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert.

#### *B) Standardpuffer B (Tris–HCl 50 mM)*

60,66 g Tris (100 840, Fa. Paesel + Lorei) wurden in 9 l bidest. Wasser gelöst. Der pH – Wert wurde mit HCl 37 % auf 7,40 eingestellt. Das Volumen wurde mit bidest. Wasser ad 10 l aufgefüllt. Der Puffer wurde bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert.

*C) [<sup>3</sup>H]Glibenclamid–Stammlösung (3 nM; 51,4 Ci/mmol; radiochemische Reinheit > 99 %)*  
 4 µl [<sup>3</sup>H]Glibenclamid (250 µCi/250 µl, NET 1024, Fa. Dupont) wurden mit 40 ml Standardpuffer B (3.4.1 B) vermischt. Die Konzentration von [<sup>3</sup>H]Glibenclamid wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung kontrolliert und korrigiert, wenn die Abweichung vom Sollwert (33840 dpm/100 µl) größer als 5 % war.

*D) [<sup>3</sup>H]P1075–Stammlösung (30 nM; 121 Ci/mmol; radiochemische Reinheit > 99 %)*  
 360 µl [<sup>3</sup>H]P1075 (250 µCi/5000 µl, TRK949, Fa. AEA Technology) wurden mit 4640 µl Standardpuffer B (3.4.1 B) vermischt. Die Konzentration von [<sup>3</sup>H]P1075 wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung kontrolliert und korrigiert, wenn die Abweichung vom Sollwert (79920 dpm/10 µl) größer als 5 % war.

*E) MgATP-Lösung (1mM)*  
 0,73 mg ATP (519987, Fa. Roche) wurden in 1200 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung gelöst.

*F) Magnesiumchlorid-Lösung (10 mM)*  
 101,6 mg Magnesiumchlorid (1.05833, Fa. Merck) wurden in 50 ml Standardpuffer B (3.4.1 B) gelöst.

*G) Glibenclamid-Stammlösung (1 mM)*  
 4,94 mg Glibenclamid (Fa. Aventis) wurden unter Rühren in 10 ml 50 mM NaOH über Nacht bei 37 °C gelöst.

*H) Glibenclamid-Lösung (1 µM)*  
 Die Glibenclamid-Lösung wurde durch 1:1000 Verdünnung der Glibenclamid-Stammlösung (3.4.1 G) mit Standardpuffer B (3.4.1 B) hergestellt.

*I) Pinacidil-Lösung (1 mM)*  
 5,26 mg Pinacidil-Monohydrat (Fa. Leo Pharmaceutical Products) wurden in 1 ml 25 mM HCl gelöst. Diese Stammlösung wurde 1:20 mit Standardpuffer B (3.4.1 B) verdünnt.

### 3.4.2 Stammlösungen der eingesetzten Testsubstanzen

Von jedem verdrängenden Liganden wurde eine Stammlösung in einem geeigneten Lösungsmittel (s. unten) angesetzt, aus der durch stufenweise Verdünnung mit Standardpuffer A (3.4.1 A) die jeweils benötigten verdünnten Lösungen hergestellt wurden. Die eingesetzten Endkonzentrationen der Testsubstanzen sind im Ergebnisteil angegeben.

Die Testsubstanzen wurden an Membranen von COS1-Zellen, die SUR1, SUR2A oder SUR2B exprimierten, untersucht. Die in dieser Auflistung mit einem (\*) gekennzeichneten Verbindungen wurden nur an Membranen mit SUR1 oder SUR2A getestet.

*A) 5-Chlor-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-2-methoxybenzamid (1 mM)*

3,06 mg 5-Chlor-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-2-methoxybenzamid (MG 305,76) wurden in 100 µl DMSO gelöst. 20 µl dieser Lösung wurden unter Rühren tropfenweise zu 1980 µl 50 mM NaOH gegeben.

*B) {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat (10 mM)*

3,86 mg {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat (MG 385,74) wurden in 1 ml 50 mM NaOH gelöst.

*C) Repaglinid (AG-EE 623 ZW) (1 mM)*

1,13 mg Repaglinid (AG-EE 623 ZW; Fa. Boehringer Ingelheim, MG 452,60) wurden unter zweistündigem Rühren bei 37 °C in 2,5 ml 50 mM NaOH gelöst.

*D) AG-EE 624 ZW (1mM)\**

1,13 mg AG-EE 624 ZW ((-)-2-Ethoxy-4-{2-[[3-methyl-1-[2-(1-piperidinyl) phenyl] butyl] amino]-2-oxoethyl}-benzoesäure; Fa. Boehringer Ingelheim, MG 452,60) wurden unter zweistündigem Rühren bei 37 °C in 2,5 ml 50 mM NaOH gelöst.

*E) AG-EE 319 ZW (1 mM)*

0,986 mg AG-EE 319 ZW ((+)-4-{2-[[1-[2-(1-Piperidinyl)phenyl]butyl]amino]-2-oxoethyl}-benzoesäure; Fa. Boehringer Ingelheim, MG 394,52) wurden unter zweistündigem Rühren bei 37 °C in 2,5 ml 50 mM NaOH gelöst.

*F) AG-EE 436 ZW (1 mM)*

0,986 mg AG-EE 436 ZW ((-)-4-{2-[[1-[2-(1-Piperidiny)phenyl]butyl]amino]-2-oxoethyl}-benzoesäure; Fa. Boehringer Ingelheim, MG 394,52) wurden unter zweistündigem Rühren bei 37 °C in 2,5 ml 50 mM NaOH gelöst.

*G) AG-DD 1461 ZW (1 mM)*

0,88 mg AG-DD 1461 ZW (4-{2-[[[2-(1-Piperidiny)phenyl]methyl]amino]-2-oxoethyl}-benzoesäure; Fa. Boehringer Ingelheim, MG 352,43) wurden unter zweistündigem Rühren bei 37 °C in 2,5 ml 50 mM NaOH gelöst.

*H) HMR 1402 (1 mM)*

1,076 mg HMR 1402 (1-{[5-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]-2,4-dimethoxyphenyl]sulfonyl}-3-methylthioharnstoff; Fa. Aventis, MG 538,02) wurden in 2 ml bidest. Wasser gelöst.

*I) S 920707 (1 mM)*

0,911 mg S 920707 (1-{[5-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)-ethyl]-2- methoxyphenyl] sulfonyl}-3-methylharnstoff; Fa. Aventis, MG 455,5) wurden in 2 ml 10 mM NaOH gelöst.

*J) S 981639 (1 mM)*

1,119 mg S 981639 (1-{3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-N-[2-(4-(2-methoxyethoxy)-3-sulfamoyl-phenyl)ethyl]acrylamoyl}-3-methylthioharnstoff; Fa. Aventis, MG 559,64) wurden in 2 ml bidest. Wasser gelöst.

*K) S 951729 (1 mM)\**

0,996 mg S 951729 ((+)-N- {[4- [(5- Chlor-2- methoxybenzamido) methyl] -7- methoxy -6-chromanyl]sulfonyl}-N-methylharnstoff; Fa. Aventis, MG 49796) wurden in 2 ml 10 mM NaOH gelöst.

*L) S 951957 (1 mM)*

0,996 mg S 951957 ((-)-N- {[4- [(5- Chlor-2- methoxybenzamido) methyl] -7- methoxy -6-chromanyl]sulfonyl}-N-methylharnstoff; Fa. Aventis, MG 497,96) wurden in 2 ml 10 mM NaOH gelöst.



### 3.4.3 Vorbereitung der Membranen

Ein Aliquot der bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Membranen (s. 3.3.4.2) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut, in Standardpuffer A (3.4.1 A) resuspendiert, in ein 0,5 ml Reagiergefäß überführt und 8–10 mal für je eine Sekunde unter Eiskühlung extern beschallt (Sonifier B–12, Fa. Branson Sonic Power Company; output control: Stufe 7, duty cycle 25 %, nicht gepulst; Ausrüstung: Standard–Resonator). Die Membransuspension wurde mit Standardpuffer A (3.4.1 A) auf das benötigte Volumen verdünnt.

### 3.4.4 Gleichgewichts-Bindungsexperimente

#### 3.4.4.1 Prinzip des Filtrationsassays

Die Vakuumfiltration durch Glasfaserfilter ist ein verbreitetes Verfahren zur Trennung von freiem und gebundenem Liganden bei Radioligand-Bindungsstudien (BENNETT, 1978; REPKE und LIEBMANN, 1987). Der Radioligand–Rezeptor–Komplex ist während der Vakuumfiltration allerdings über einen kurzen Zeitraum einem radioligandfreien Waschpuffer (3.4.1 B) ausgesetzt, so dass bei höherer Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes die Gefahr besteht, falsch zu niedrige Werte für den rezeptorgebundenen Radioliganden zu erhalten. Daher wird dieses Verfahren nur für solche Radioligand–Rezeptor–Komplexe empfohlen, deren Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich liegen (REPKE und LIEBMANN, 1987).

Da die Affinitäten der Sufonylharnstoffe und Analoga zu den SUR2-Isoformen für eine direkte Bestimmung mit Hilfe des Filtrationsassays zu niedrig sind (hohe Dissoziationsgeschwindigkeit des Ligand-Rezeptor-Komplexes während des Filterwaschens), wurde eine indirekte Bestimmung der Rezeptorbindung durch Verdrängung von markiertem P1075 durchgeführt. Aus den gemessenen  $\text{IC}_{50}$ -Werten wurden die Dissoziationskonstanten nach CHENG und PRUSOFF (1973) errechnet (s. 3.6.3), weil eine negativ allosterische Kopplung zwischen den Bindungsstellen für Sulfonylharnstoffe einerseits und für P1075 andererseits angenommen werden kann (SCHWANSTECHEER et al., 1998; HAMBROCK et al., 1998).

#### 3.4.4.2 Inkubationen

##### A) Bindung von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid an SUR1

Das Inkubationsmedium (1 ml) enthielt Standardpuffer A (3.4.1 A) in einer Endkonzentration von 180 mM. Die [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid-Konzentration im Inkubationsmedium betrug 0,3 nM. Die Endkonzentrationen der zugesetzten Testsubstanzen wurden durch Zusatz von Aliquoten der Stammlösungen (s. 3.4.2) zum Inkubationsmedium eingestellt. Mikrosomales Protein wurde in einer Endkonzentration von etwa 5  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Die unspezifische Bindung

( $2 \pm 0,2$  %,  $N = 20$ ) wurde bestimmt durch parallele Inkubation von Ansätzen, die zusätzlich 100 nM nicht-markiertes Glibenclamid (3.4.1 H) enthielten. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung ermittelt. Die Inkubationen wurden in 2 ml-Reagiergefäßen ohne Deckel (Fa. Sarstedt) bei Raumtemperatur durchgeführt. Gestartet wurden die Inkubationen durch Zugabe von mikrosomalem Protein. Die Inkubationen wurden nach 60 min durch Filtration beendet.

#### *B) Bindung von [ $^3$ H]P1075 an SUR2A oder SUR2B*

Das Inkubationsmedium (500  $\mu$ l) enthielt Standardpuffer A (3.4.1 A) in einer Endkonzentration von 140 mM. Die [ $^3$ H]P1075-Konzentration im Inkubationsmedium betrug 3 nM, außerdem waren 100  $\mu$ M MgATP (3.4.1 E) und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (3.4.1 F) enthalten. Die Endkonzentrationen der zugesetzten Testsubstanzen wurden durch Zusatz von Aliquoten der Stammlösungen (s. 3.4.2) zum Inkubationsmedium eingestellt. Mikrosomales Protein wurde in einer Endkonzentration von etwa 30-70  $\mu$ g/ml zugesetzt. Die unspezifische Bindung ( $13 \pm 0,9$  % bei Bindung an SUR2A,  $N = 20$  bzw.  $9 \pm 0,5$  % bei Bindung an SUR2B,  $N = 20$ ) wurde bestimmt durch parallele Inkubation von Ansätzen, die zusätzlich 100  $\mu$ M nicht-markiertes Pincidil (3.4.1 I) enthielten. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung bestimmt. Die Inkubationen erfolgten in 1,5 ml-Reagiergefäßen ohne Deckel (Fa. Sarstedt) bei Raumtemperatur. Gestartet wurden die Inkubationen durch Zugabe von mikrosomalem Protein. Die Inkubationen wurden nach 60 min durch Filtration beendet.

#### **3.4.5 Filtration und Szintillationszählung**

Die Filtrationsapparatur bestand aus einer 2 l-Saugflasche mit einem Membranfilteraufsatz für Filter mit einem Durchmesser von 25 mm. Die Saugflasche war an eine Vakuumpumpe (Fa. Vacuubrand) angeschlossen. Es wurden Glasfaserfilter (Whatman GF/B, 25 mm Durchmesser) benutzt, die vor Verwendung 15 min bei 4 °C in Standardpuffer B (3.4.1 B) eingelegt wurden. Das Inkubationsgemisch eines Ansatzes (1 ml bzw. 500  $\mu$ l) wurde auf das Filter pipettiert und das Filter anschließend dreimal mit je 4 ml auf 4 °C gekühltem Standardpuffer B (3.4.1 B) gespült. Nach dem Spülvorgang wurde das Filter in ein Zählgefäß (Mini Vial C, Fa. Roth) überführt. Der [ $^3$ H]-Gehalt der Filter wurde nach Zusatz von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumasafe™ Plus, Fa. Lumac \* LSC B.V., Niederlande) und Äquilibration (24 h, Raumtemperatur) in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Tri-Carb 2100 TR, Fa. Canberra-Packard) ermittelt.

### 3.5 Elektrophysiologische Registrierung

#### 3.5.1 Basislösungen

*A) Pipettenlösung (2,6 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES, 146 mM KCl, 1,2 mM  $\text{MgCl}_2$ )*

38,23 mg Calciumchlorid (2382, Fa. Merck), 238,3 mg HEPES (242608, Fa. Roche), 1,09 g Kaliumchlorid (1.04935, Fa. Merck) und 24,4 mg Magnesiumchlorid (1.05833, Fa. Merck) wurden in 100 ml bidest. Wasser gelöst, der pH-Wert der Lösung mit 2N KOH auf 7,40 eingestellt und die Lösung maximal drei Monate bei 4 °C aufbewahrt.

*B) Intrazelluläre Lösung (IZ; 140 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM EGTA, 5 mM HEPES)*

20,88 g Kaliumchlorid (1.04935, Fa. Merck), 406,6 mg Magnesiumchlorid (1.05833, Fa. Merck), 588,1 mg Calciumchlorid (2382, Fa. Merck), 7,61 g EGTA (E-4378, Fa. Sigma) und 2,38 g HEPES (242608, Fa. Roche) wurden in 2 l bidest. Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 2N KOH auf 7,30 eingestellt und die Lösung bis zu einer Woche bei 4 °C aufbewahrt. Die freie  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration wurde bei 0,7 mM gehalten. Die zur Einstellung der Endkonzentration erforderliche Menge an Magnesiumchlorid wurde mit Hilfe eines Computerprogrammes errechnet (FABIATO, 1988) und mit einer 1M  $\text{MgCl}_2$ -Stammlösung entsprechend eingestellt.

#### 3.5.2 Lösungen der eingesetzten Nukleotide

*A) ATP-Lösung (1 mM)*

30,25 mg ATP (519987, Fa. Roche) und 8,14 mg Magnesiumchlorid (1.05833, Fa. Merck) wurden in 50 ml IZ (3.5.1 B) gelöst.

*B) ADP-Lösung (0,3 mM)*

22,56 mg ADP (1413374, Fa. Roche) wurden in 150 ml IZ (3.5.1 B) gelöst.

#### 3.5.3 Stammlösungen der eingesetzten Testsubstanzen

Von den Testsubstanzen wurde eine Stammlösung in einem geeigneten Lösungsmittel (s. unten) angesetzt, aus der durch stufenweise Verdünnung mit IZ (3.5.1 B), die zusätzlich 0,3 mM ADP (3.5.2 B) enthielt, die jeweils benötigten verdünnten Lösungen täglich frisch hergestellt wurden. Die eingesetzten Endkonzentrationen der Testsubstanzen sind im Ergebnisteil angegeben. Bei allen Lösungen wurde der pH-Wert mit 2 N KOH auf 7,30 eingestellt.

*A) {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat (10 mM)*

3,86 mg {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat (MG 385,74) wurden in 1 ml 50 mM KOH gelöst.

*B) AG-EE 319 ZW (1 mM)*

0,986 mg AG-EE 319 ZW ((+)-4-{2-[[1-[2-(1-Piperidiny)phenyl]butyl]amino]-2-oxoethyl}-benzoesäure; Fa. Boehringer Ingelheim, MG 394,52) wurden unter zweistündigem Rühren bei 37 °C in 2,5 ml 50 mM KOH gelöst.

### **3.5.4 Patch-Clamp-Technik in der Inside-out-Konfiguration**

Die Inside-out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik (HAMILL et al., 1981) wurde zur Aufzeichnung der Ströme durch SUR1/K<sub>IR</sub>6.2-Kanäle benutzt. Die Experimente an COS1-Zellen erfolgten bei Raumtemperatur (20-22 °C) in 35 mm Petrischalen unter Verwendung eines inversen Mikroskopes (IM 35, Fa. Zeiss). Die Pipetten wurden aus Borosilikatglas (2 mm Außendurchmesser, 0,3 mm Wandstärke) mit Hilfe eines vertikalen Pipettenziehgerätes (Patch Pipetten Puller PA-10, Fa. E.S.F. electronic) hergestellt und an der Spitze hitzepoliert, indem sie für 20 Sekunden vor einen mit Glas überzogenen und erhitzten Platin-Iridium-Draht gehalten wurden. Die verwendeten Pipetten besaßen an der Spitze einen Durchmesser von etwa 1 µm, die Widerstände der Pipetten lagen nach der Füllung mit der Pipettenlösung bei 6-9 MΩ. Die Pipettenspitze wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators nahe an die Zelloberfläche herangeführt, wobei eine leichte Erhöhung des Pipettenwiderstandes eine geringe Entfernung zur Zelloberfläche anzeigte. Durch vorsichtiges Ansaugen eines Membranstückes an die Pipettenöffnung und anschließendes Anlegen eines Pipettenpotentials von -20 mV wurde das Membranstück elektrisch von der Umgebung und ihrem Hintergrundrauschen isoliert. Dabei konnten Abdichtungswiderstände zwischen Pipette und Zellmembran im Gigaohm-Bereich erzielt werden (Gigaseal). Nach Bildung eines Gigaseals befand sich das Präparat in der Cell-attached-Konfiguration. Zur Erzeugung eines Inside-out-Patches wurde die Pipette langsam von der Zelle zurückgezogen, wodurch ein Membranstück von der Zelle gelöst wurde, ohne dass sich die Größe des Sealwiderstandes merklich veränderte. Um die Stabilität der Membran zu gewährleisten, wurde das zur Erzeugung des Gigaseals notwendige Pipettenpotential von -20 mV auf +50 mV eingestellt. Die so erhaltene Inside-out-Konfiguration war dadurch gekennzeichnet, dass die zytoplasmatische Oberfläche des Membranpatches der Badseite (intrazelluläre Lösung) zugewandt war, während die Membranaußenseite zum Pipetteninneren wies. Somit stellten Ströme positiv geladener Ionen in die Zelle hinein Einwärtsströme dar,

die in allen Registrierungen als negative (abwärts) Auslenkung angegeben wurden.

### 3.5.5 Versuchsaufbau

Als Versuchszellen dienten COS1-Zellen, die SUR1/K<sub>IR</sub>6.2 exprimierten. Die Versuche fanden in Gegenwart von 0,3 mM ADP (3.5.2 B) statt. Zunächst wurden alle K<sub>ATP</sub>-Kanäle durch Applikation von 1 mM ATP-Lösung (3.5.2 A) geschlossen. Das Ersetzen von ATP durch 0,3 mM ADP führte zur Öffnung der Kanäle. In diesem Stadium wurde zusätzlich zu 0,3 mM ADP die kanalschließende Testsubstanz zugegeben. Dieser Testphase folgte eine Kontrollphase, in der wieder nur 0,3 mM ADP an den Patch gegeben wurde. Der Versuch wurde abgeschlossen durch eine erneute Applikation von 1 mM ATP an den Patch, um die Kanäle wieder zu schließen.

### 3.5.6 Auswertung

Die Registrierungen wurden unter Verwendung eines L/M-EPC7 Patch-Clamp-Verstärkers (Fa. List Electronic) durchgeführt. Die Stromsignale wurden bei 2 kHz mit einem 4-Pol Bessel-Filter (LPBF-48DG, np) Tiefpass gefiltert, mit einem A/D-Wandler digitalisiert (VR-10B, Fa. Instrutech, New York, USA) und auf einem Videoband gespeichert. Zur Auswertung wurden diese Daten mit 10 kHz unter Einsatz eines Axolab 1200 Adapters (Fa. Axon Instruments, Foster City, USA) digitalisiert und mit einem Analyseprogramm (pCLAMP 6.0, Fa. Axon Instruments, Foster City, USA) ausgewertet.

In Experimenten, in denen mehr als fünf K<sub>ATP</sub>-Kanäle gleichzeitig geöffnet waren, wurde der Effekt von 1 mM ATP (K<sub>ATP</sub>-Kanäle geschlossen) registriert. Unter Verwendung von pCLAMP 6.0 (Axon Instruments, USA) wurde dann der mittlere K<sub>ATP</sub>-Strom gemessen, und zwar während der letzten Minute der Kontrollphasen (in Anwesenheit von 0,3 mM ADP) vor und nach Testsubstanz-Applikation und nach Einstellung eines neuen Gleichgewichts in Gegenwart der Testsubstanz. Die relative K<sub>ATP</sub>-Kanal-Aktivität errechnete sich aus den gemessenen Stromflüssen in [pA] wie folgt:

$$\text{relative Kanal - Aktivität} = \frac{\text{Testsubstanz [pA]} - \text{ATP [pA]}}{\text{ADP [pA]} - \text{ATP [pA]}} * 100.$$

### 3.6 Datenauswertung von Bindungs- und Patch-Clamp-Experimenten

#### 3.6.1 Statistik

Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM für N unabhängige Experimente unter Verwendung unabhängiger Membranpräparationen für die Bindungsexperimente. Signifikanzen wurden unter Verwendung des zweiseitigen U-Tests von Wilcoxon und von Mann und Whitney berechnet (WALLENSTEIN et al., 1980).  $P < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

#### 3.6.2 Konzentrations-Bindungs- und Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Folgende Funktion wurde zur Analyse der Beziehung zwischen Substanzkonzentration und Bindung oder Kanal-Aktivität verwendet:

$$y = \frac{a - b}{1 + \left( \frac{EC_{50}}{x} \right)^n} + b$$

y ist die spezifische Bindung oder relative  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität, a der Maximalwert der spezifischen Bindung oder relativen Kanal-Aktivität,  $EC_{50}$  die halbmaximal-wirksame Substanzkonzentration, x die freie Substanzkonzentration, n der Steigungsparameter (Hill-Koeffizient) und b der Minimalwert der spezifischen Bindung oder der relativen Kanal-Aktivität.

#### 3.6.3 Dissoziationskonstanten

Die Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) für die Bindung an den Sulfonylharnstoff-Rezeptor wurden unter Verwendung der Beziehung (CHENG und PRUSOFF, 1973):

$$K_D = \frac{IC_{50}}{1 + \left( \frac{X_{(R)}}{K_{D(R)}} \right)}$$

aus den halbmaximal-inhibitorischen Konzentrationen ( $IC_{50}$ ) berechnet.

$K_D$  ist die Dissoziationskonstante der verdrängenden Substanz,  $X_{(R)}$  die Konzentration und  $K_{D(R)}$  die Dissoziationskonstante des Radioliganden.

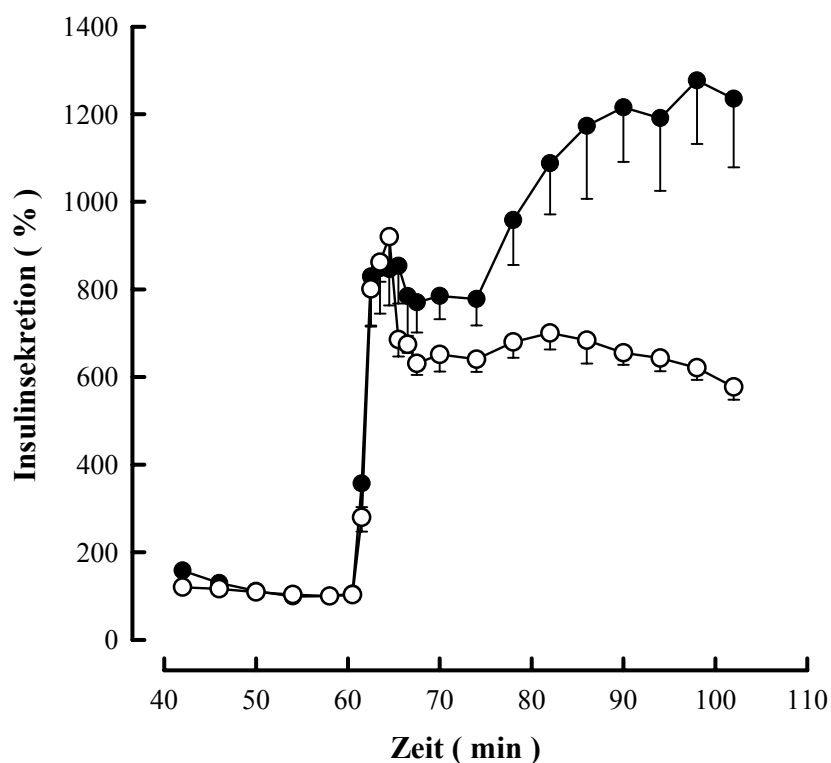
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln

#### 4.1.1 Steigerung der Insulinsekretion durch Glucose

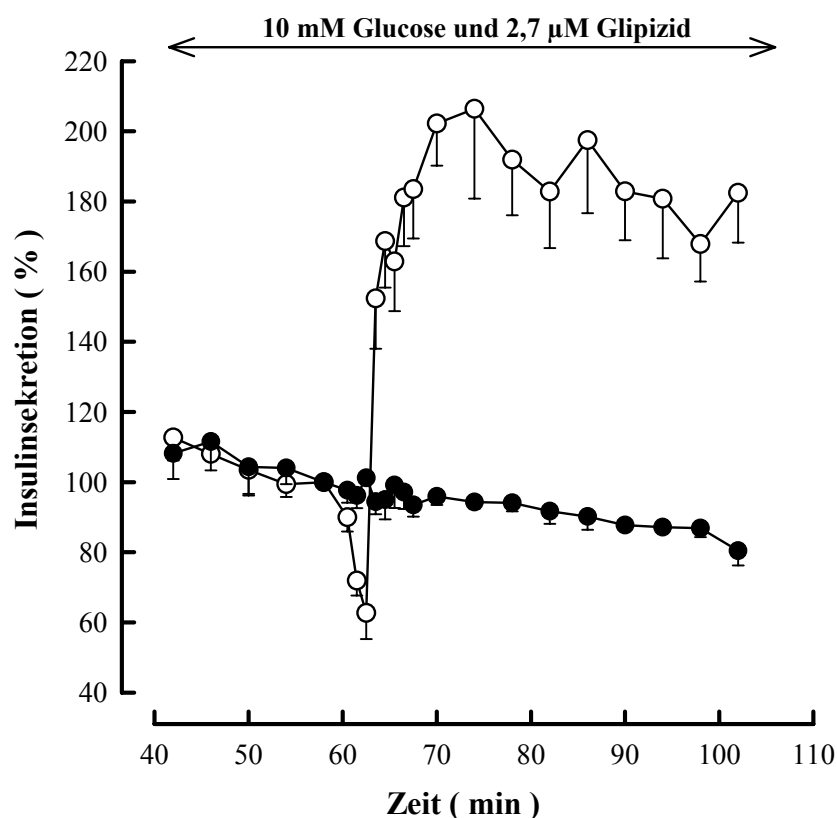
Die bekannt starke Insulin-freisetzende Wirkung von Glucose diente als Kontrollstimulus zur Charakterisierung der verwendeten Versuchsanordnung. Die Stimulation einer biphasischen Insulinsekretion durch Glucose wurde schon 1968 beschrieben (CURRY et al.). Eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 10 mM auf 40 mM bewirkte eine initiale Steigerung der Sekretionsrate von 100 % (Minute 58) auf 850 % nach 6 Minuten. In den folgenden 10 Minuten sank das Sekretionsniveau auf 780 %, um danach eine langanhaltende Plateauphase bei etwa 1200 % (Minute 86-102) zu erreichen (Abb. 4.1).

Auch die Zugabe einer maximal wirksamen Konzentration des Sulfonylharnstoffs Glipizid (2,7  $\mu$ M, entsprechend einer freien Konzentration von 1,6  $\mu$ M; PANTEN et al., 1989) zu mit 10 mM Glucose vorbehandelten Inseln bewirkte ein biphasisches Sekretionsmuster. 5 Minuten nach Mediumwechsel erreichte die Sekretion den Spitzenwert von 920 % im Vergleich zum Ausgangsniveau (100 % bei Minute 58) und fiel dann in den nächsten Minuten wieder ab auf Werte im Bereich von 650 % (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1** Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln durch Erhöhung der Glucosekonzentration von 10 mM auf 40 mM (●) oder durch Zugabe von 2,7  $\mu$ M Glipizid zu 10 mM Glucose (○) ab Minute 61. Bei Perfusionen mit Glipizid enthielt das Medium 10 mM Glucose von Minute 1-104. Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Prozent in Abhängigkeit von der Perfusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte - SEM aus 4 Einzelexperimenten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 58) wurde auf 100 % gesetzt.

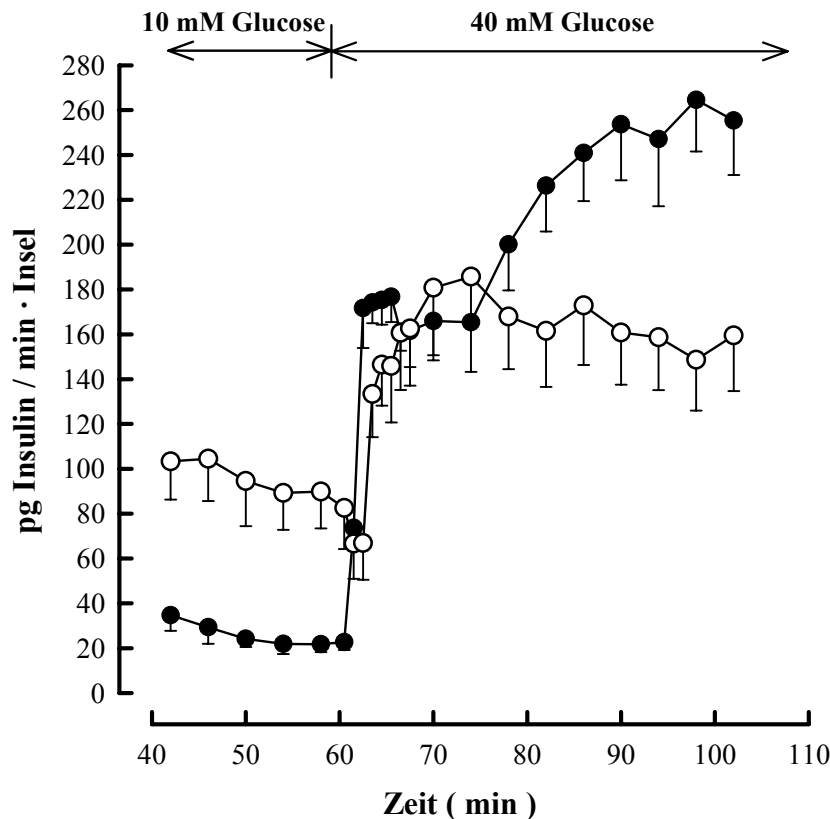
Selbst wenn alle  $K_{ATP}$ -Kanäle durch  $2,7 \mu\text{M}$  Glipizid schon geschlossen waren, bewirkte die Erhöhung der Glucosekonzentration von  $10 \text{ mM}$  auf  $40 \text{ mM}$  eine verstärkte Insulinsekretion (Abb. 4.2). Diese  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion durch Glucose zeigte ein verändertes Sekretionsprofil. Die Sekretionsrate nahm in den ersten 3 Minuten nach Mediumwechsel auf  $63 \%$  ab und erhöhte sich dann nach weiteren 4 Minuten auf Werte im Bereich von  $180\text{-}200 \%$ . Der geringere Anstieg der Sekretionsrate in Gegenwart von Glipizid ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass durch das Vorhandensein von  $10 \text{ mM}$  Glucose und  $2,7 \mu\text{M}$  Glipizid im Kontrollmedium schon vor der Erhöhung der Glucosekonzentration auf  $40 \text{ mM}$  die Insulinsekretion etwa 4-mal so hoch war wie ohne Glipizid im Kontrollmedium (die mittleren absoluten Sekretionsraten lagen von Minute 42-58 bei durchschnittlich  $96$  bzw.  $26 \text{ pg Insulin/min} \cdot \text{Insel}$ , Abb. 4.3).



**Abb. 4.2** Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln bei Perifusion mit  $10 \text{ mM}$  Glucose und  $2,7 \mu\text{M}$  Glipizid von Minute 1-104 (●) bzw. nach Zugabe von  $30 \text{ mM}$  Glucose zu  $10 \text{ mM}$  Glucose und  $2,7 \mu\text{M}$  Glipizid ab Minute 61 (○). Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte – SEM aus 4 Einzelexperimenten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 58) wurde auf  $100 \%$  gesetzt.

Die initiale Hemmung der Insulinsekretion durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration von  $10 \text{ mM}$  auf  $40 \text{ mM}$  fand nur statt in Gegenwart von Sulfonylharnstoffen wie Glipizid und wurde schon früher beschrieben (PANTEN et al., 1988). Dieser Hemmeffekt wurde deutlich, wenn man den Verlauf der Sekretion mit dem Verlauf eines Kontrollversuchs ohne Zusatz von Testsubstanz verglich (Abb. 4.2): Bei diesem Kontrollversuch sah man eine kontinuierliche leichte Abnahme der Sekretion auf etwa  $80 \%$  (Minute 102) ab dem Zeitpunkt des Mediumwechsels (Sekretionsrate bei Minute 58 =  $100 \%$ ).





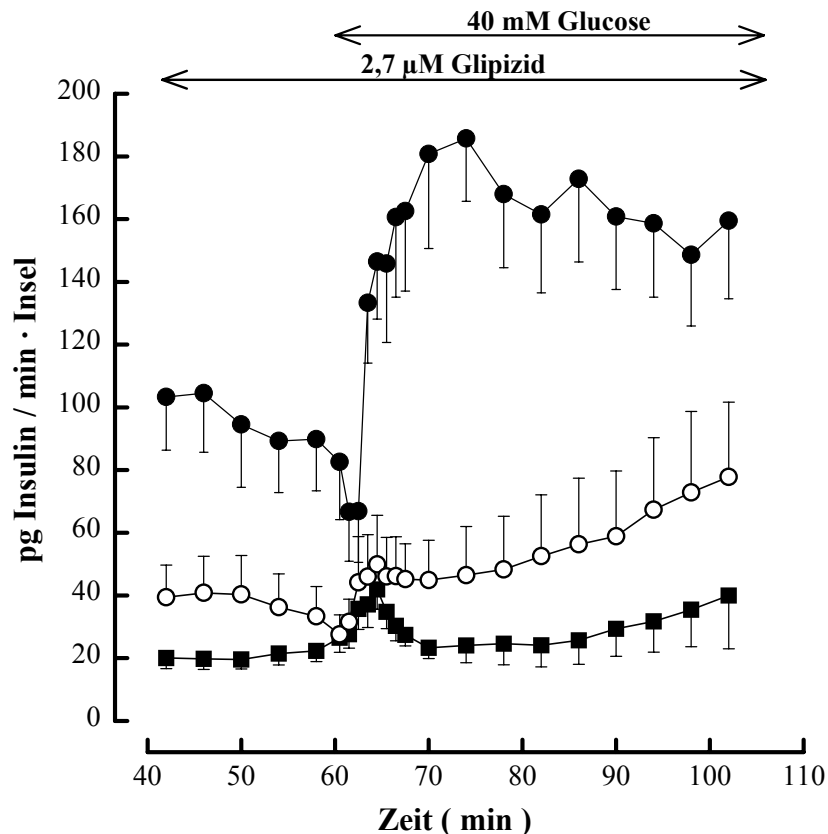
**Abb. 4.3** Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus- Pankreasinseln durch Erhöhung der Glucosekonzentration von 10 mM auf 40 mM ab Minute 61, mit (○) und ohne (●) 2,7  $\mu$ M Glipizid im Perifusionsmedium (Minute 1-104). Dargestellt sind die freigesetzten absoluten Insulinsekretionsraten in pg/min·Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte - SEM aus 4 Einzelexperimenten.

Abb. 4.4 zeigt, wie die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Sekretionsantwort auf 40 mM Glucose von der vorherigen Glucosekonzentration abhing. Inseln, die mit 10 mM Glucose perifundiert worden waren (Minute 1-60), reagierten auf die Erhöhung der Glucosekonzentration auf 40 mM mit der oben beschriebenen Weise (Darstellung der relativen Sekretionsraten der entsprechenden Experimente in Abb. 4.2).

Enthielt das Kontrollmedium nur 3 mM Glucose, war die Insulinsekretion während der Kontrollphasen in jedem Einzelversuch niedriger als in Anwesenheit von 10 mM Glucose. Die mittleren absoluten Sekretionsraten lagen bei durchschnittlich 38 bzw. 96 pg Insulin/min·Insel (Minute 42-58). Die relative Sekretionsrate war 5 Minuten nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 40 mM auf 172 % gesteigert (Sekretionsrate bei Minute 58 = 100 %), aufgrund des niedrigeren Ausgangsniveaus wurde aber wesentlich weniger Insulin abgegeben als bei den Versuchen mit 10 mM Glucose in der Kontrollphase. Nach einer kurzzeitigen Abnahme der Sekretion (137 % bei Minute 70) erfolgte ein langsamer kontinuierlicher Anstieg der Sekretionsrate (280 % bei Minute 102), wobei die Absolutrate an freigesetztem Insulin in jedem Einzelexperiment niedriger lag als bei Versuchen mit 10 mM Glucose in der Kontrollphase (im Mittel 78 bzw. 160 pg Insulin/min·Insel bei Minute 102, Abb. 4.4).

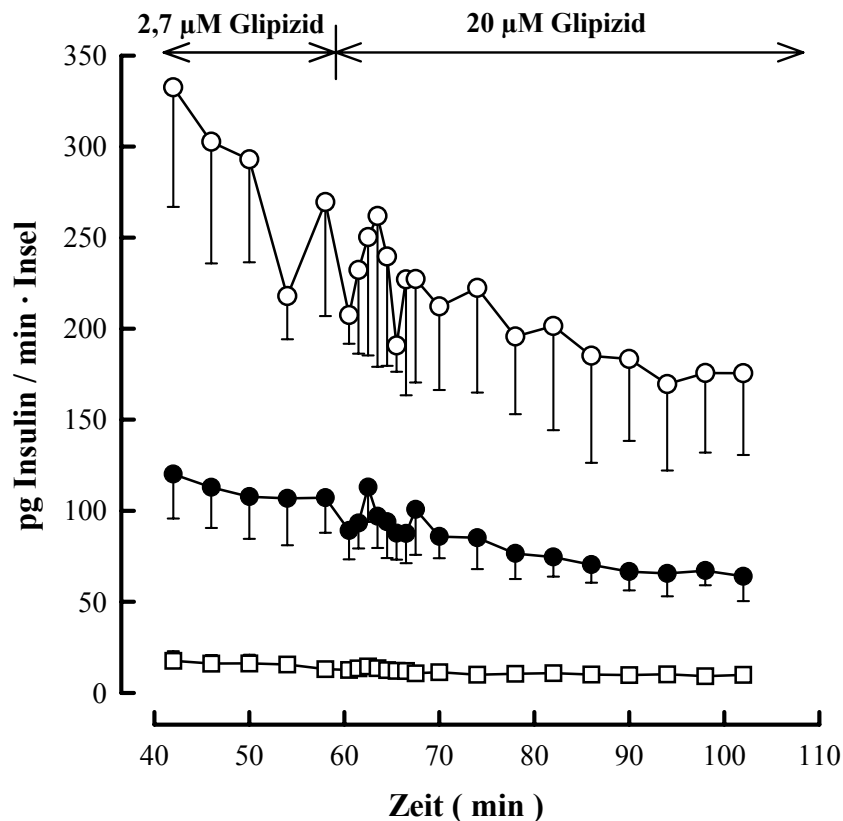
War im Kontrollmedium keine Glucose enthalten, wurde vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 42-58) im Mittel nur 21 pg Insulin/min·Insel sezerniert. 5 Minuten nach Zugabe von 40 mM Glucose war die Sekretionsrate auf 187 % erhöht (Sekretionsrate bei Mi-

Minute 58 = 100 %). Die abgegebenen Insulinmengen waren im Durchschnitt aber niedriger als bei den Versuchen mit 3 mM Glucose während der Kontrollphase. Die Sekretionsrate sank nach diesem anfänglichen Anstieg auf Werte nahe des Ausgangszustandes und stieg dann erneut langsam an (180 % bei Minute 102), wobei wiederum durchschnittlich deutlich weniger Insulin (40 pg Insulin/min•Insel bei Minute 102) freigesetzt wurde als bei den Versuchen mit 3 mM Glucose im Kontrollmedium (78 pg Insulin/min•Insel bei Minute 102, Abb. 4.4).



**Abb. 4.4**  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus- Pankreasinseln durch 40 mM Glucose in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Kontrollmedium (Medium von Minute 1-60). Die Perifusionsmedien enthielten 2,7  $\mu$ M Glipizid von Minute 1-104 und 40 mM Glucose ab Minute 61. Das Kontrollmedium enthielt 0 (■), 3 (○) oder 10 mM (●) Glucose. Dargestellt sind die freigesetzten absoluten Insulinsekretionsraten in pg/min• Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte + oder – SEM aus 4-7 Einzelexperimenten.

Um sicherzustellen, dass die eingesetzte Glipizid-Konzentration von 2,7  $\mu$ M den  $K_{ATP}$ -Kanal vollkommen schloss, wurde die Glipizid-Konzentration während der Testphase auf 20  $\mu$ M erhöht. Dies bewirkte keine Sekretionssteigerung, weder in Abwesenheit von Glucose noch in Anwesenheit von 10 oder 40 mM Glucose im Perifusionsmedium (Abb. 4.5). Nach dem Mediumwechsel auf die hohe Glipizid-Konzentration beobachtete man eine langsame kontinuierliche Abnahme der Sekretion auf durchschnittlich etwa 70 % bei Minute 102 (Sekretionsrate bei Minute 58 = 100 %). Die freigesetzten absoluten Insulinraten waren abhängig vom Glucosegehalt der Perifusionsmedien: Enthielt das Medium 40 mM, 10 mM bzw. 0 mM Glucose (Minute 1-104), so lagen die mittleren absoluten Sekretionsraten im Bereich von 175-330, 64-120 bzw. 9-18 pg Insulin/min•Insel (Minute 42-102).

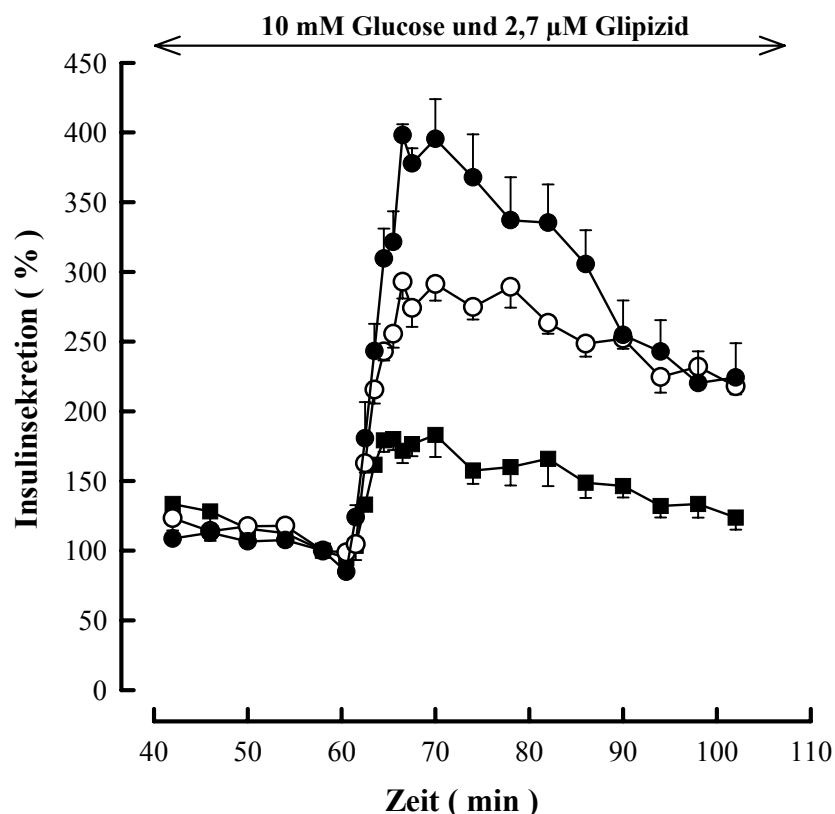


**Abb. 4.5** *Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln durch Erhöhung der Glipizid-Konzentration von 2,7 µM auf 20 µM ab Minute 61. Das Perifusionsmedium enthielt dabei 40 mM (○), 10 mM (●) oder 0 mM (□) Glucose von Minute 1-104. Dargestellt sind die freigesetzten absoluten Insulinsekretionsraten in pg/min · Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte – SEM (falls größer als das Symbol) aus 4-8 Einzelerperimenten.*

#### 4.1.2 Steigerung der Insulinsekretion durch $\alpha$ -Ketoisocapronat (KIC)

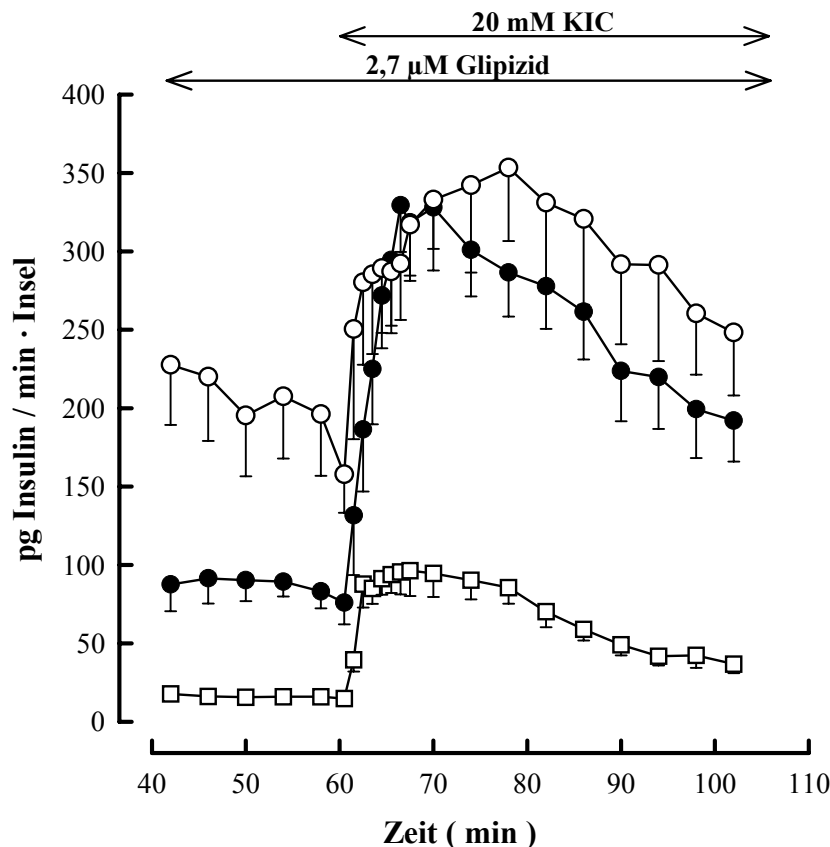
Schon seit längerer Zeit ist  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC, Abb. 2.1) als ein die Insulinfreisetzung auslösender Nährstoff für die B-Zelle bekannt (PANTEN et al., 1972). Man nimmt an, dass durch die intramitochondriale Verstoffwechselung von KIC die ATP-Produktion der B-Zelle erhöht wird. Dadurch kommt es zum Schließen der  $K_{ATP}$ -Kanäle bzw. zum Auslösen der Insulinsekretion (ASHCROFT et al., 1987).

Wenn jedoch alle  $K_{ATP}$ -Kanäle durch maximal wirksame Sulfonylharnstoff-Konzentrationen geschlossen sind, bewirkt KIC immer noch eine starke  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion (PANTEN et al., 1988). Abb. 4.6 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit dieses KIC-Effektes. Die Zugabe von 1 mM, 5 mM oder 20 mM KIC zu einem 10 mM Glucose und 2,7 µM Glipizid enthaltenden Perifusionsmedium steigerte die Sekretionsrate 10 Minuten nach dem Mediumwechsel auf 180, 280 bzw. 380 %. KIC übte also einen stärkeren  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effekt aus als Glucose, denn bereits 1 mM KIC war fast genauso wirksam wie eine maximal wirksame Glucosekonzentration von 40 mM (Steigerung der Insulinsekretion nach 10 Minuten auf 200 %, Abb. 4.2).



**Abb. 4.6**  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln durch Zugabe von 1 mM (■), 5 mM (○) oder 20 mM (●) KIC ab Minute 61. Die Perifusionsmedien enthielten 10 mM Glucose und 2,7  $\mu$ M Glipizid von Minute 1-104. Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte + oder – SEM aus 4 Einzelexperimenten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 58) wurde auf 100 % gesetzt.

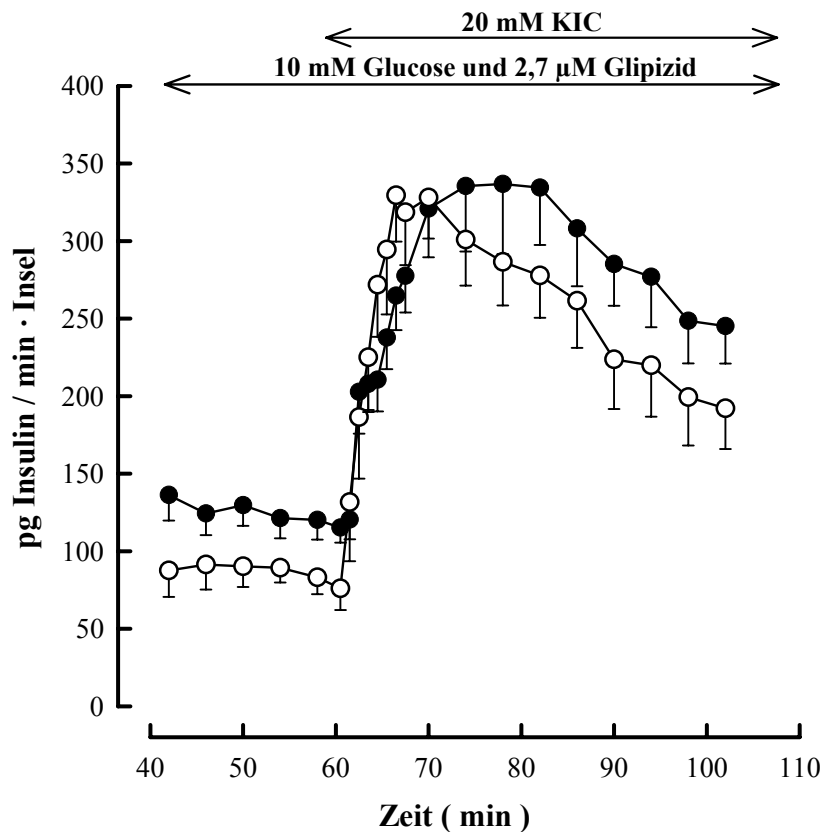
Wie bei 40 mM Glucose als Sekretionsstimulus war auch die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Wirkung von 20 mM KIC abhängig von der Glucosekonzentration in der Kontrollphase (Abb. 4.7). Enthielt das Kontrollmedium neben 2,7  $\mu$ M Glipizid 10 mM Glucose, so wurde die Sekretion 10 Minuten nach Zugabe von 20 mM KIC auf 380 % gesteigert (Darstellung der relativen Sekretionsraten der entsprechenden Experimente in Abb. 4.6). Fehlte Glucose sowohl im Kontroll- als auch im Testmedium, so bewirkte 20 mM KIC eine Erhöhung der Sekretion auf 560 % nach 6 Minuten (Abb. 4.12). Die mittleren absoluten Sekretionsraten lagen hier allerdings bei jedem Einzelversuch fast 4-mal niedriger als bei Anwesenheit von 10 mM Glucose im Medium (durchschnittlich 57 bzw. 207 pg Insulin/min•Insel von Minute 42-102, Abb. 4.7). Enthielt das Perifusionsmedium nicht 10 mM, sondern 40 mM Glucose, so führte 20 mM KIC nach 10 Minuten zu einer Sekretionssteigerung auf 175 %. Die im Vergleich zu Versuchen mit Anwesenheit von 10 mM Glucose geringere relative Sekretionssteigerung ist darauf zurückzuführen, dass schon vor Zugabe von KIC ein 2,4fach erhöhtes Sekretionsniveau vorlag (von Minute 42-58 lagen die mittleren absoluten Sekretionsraten bei durchschnittlich 209 bzw. 88 pg Insulin/min•Insel). Bei Applikation von KIC war die absolute Sekretionsrate in Anwesenheit von 40 mM Glucose kaum höher als bei Vorhandensein von 10 mM Glucose im Medium (von Minute 65-102 lagen die mittleren absoluten Sekretionsraten bei durchschnittlich 304 bzw. 270 pg Insulin/min•Insel).



**Abb. 4.7**  $K_{ATP}$ - Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus- Pankreasinseln durch 20 mM KIC in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Medium. Das Perifusionsmedium enthielt 2,7  $\mu$ M Glipizid und 0 (□), 10 (●) oder 40 (○) mM Glucose von Minute 1-104. 20 mM KIC wurde ab Minute 61 hinzugefügt. Dargestellt sind die freigesetzten absoluten Insulinsekretionsraten in pg/min·Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte – SEM aus 4-6 Einzelexperimenten.

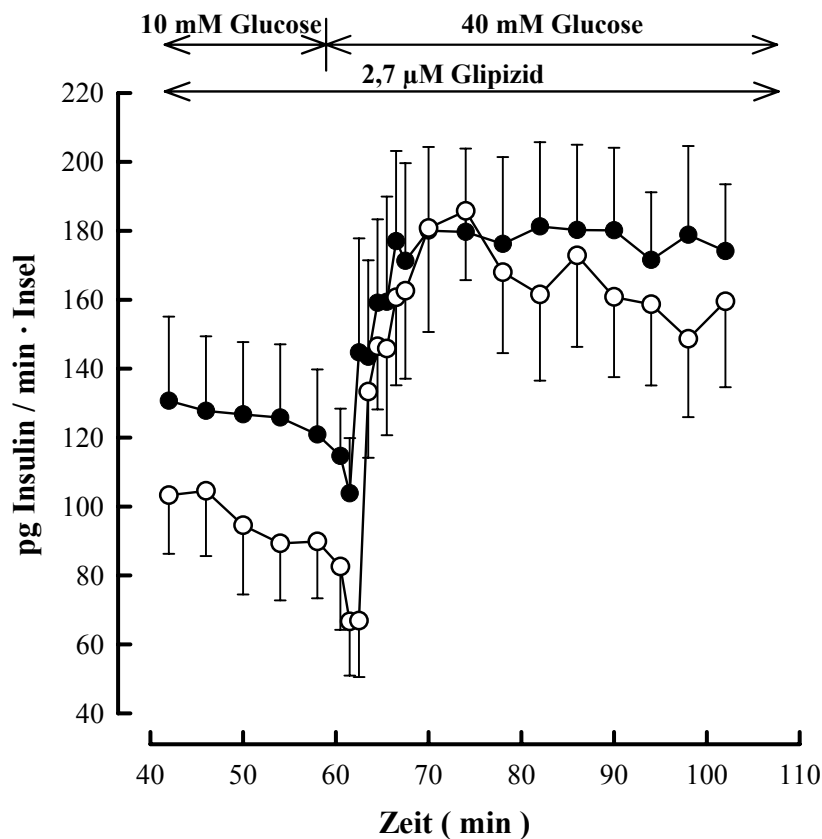
KIC wird unter Verbrauch von Glutamat metabolisiert (ICHIHARA et al., 1975). Um sicherzugehen, dass sich der Verbrauch von Glutamat nicht limitierend auf die KIC-induzierte Insulinsekretion auswirkt, wurden auch Perfusionen mit 20 mM KIC in Gegenwart von 10 mM Glutamin durchgeführt. Glutamin kann im Gegensatz zu Glutamat die B-Zellmembran passieren und wird intrazellulär durch Glutaminase zu Glutamat desaminiert.

In Anwesenheit von 10 mM Glutamin war die Insulinsekretion in der Kontrollphase etwa 45 % höher als ohne Glutamin (von Minute 42-58 lagen die mittleren absoluten Sekretionsraten bei durchschnittlich 128 bzw. 88 pg Insulin/min·Insel, Abb. 4.8). Durch Zugabe von 20 mM KIC wurden sowohl mit als auch ohne Glutamin im Medium nach 10 Minuten etwa 320 pg Insulin/min·Insel abgegeben (von Minute 65-102 lagen die mittleren absoluten Sekretionsraten bei durchschnittlich 283 bzw. 270 pg Insulin/min·Insel). Also führte das Vorhandensein von Glutamin nicht zu einer gesteigerten KIC-induzierten Insulinsekretion. Der Glutamat-Bestand der B-Zellen wirkte unter den gewählten Versuchsbedingungen daher offenbar nicht limitierend auf die durch KIC ausgelöste  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion.



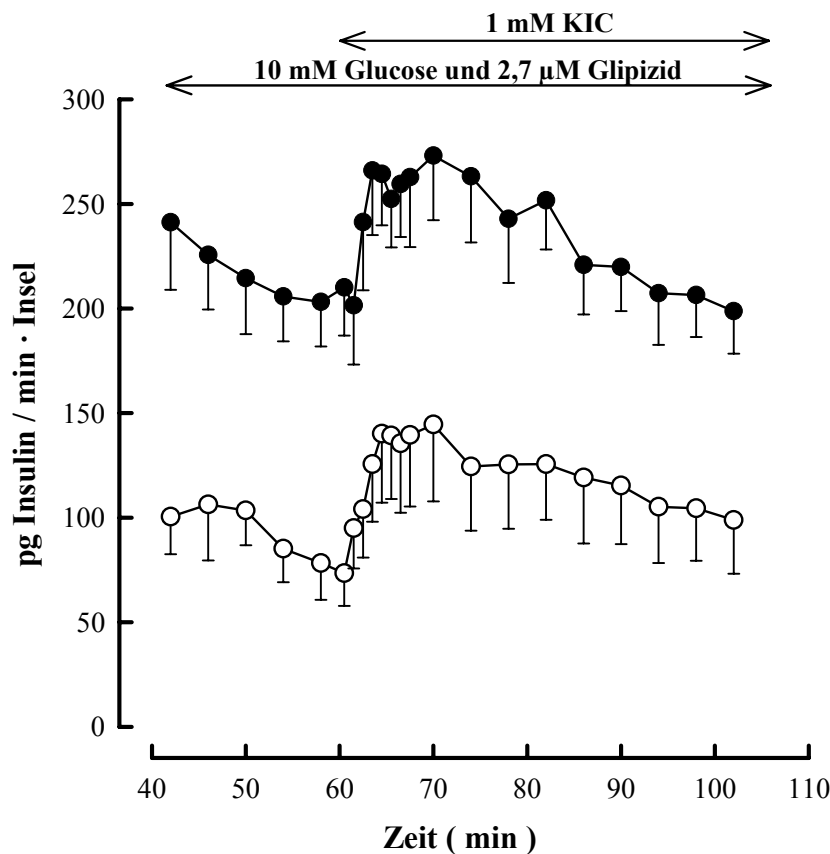
**Abb. 4.8**  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln durch 20 mM KIC in Abhängigkeit von Glutamin. Von Minute 1-104 enthielten die Perifusionsmedien 10 mM Glucose und 2,7 µM Glipizid. 20 mM KIC wurde ab Minute 61 zugefügt. Die Versuche fanden ohne Glutamin (○) oder in Gegenwart von 10 mM Glutamin (●) statt (Minute 1-104). Dargestellt sind die freigesetzten absoluten Insulinsekretionsraten in pg/min·Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte – SEM aus 4 – 5 Einzelexperimenten.

Abb. 4.9 zeigt die Wirkung von Glutamin auf den  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effekt der Glucose. Auch bei diesen Versuchen war in Gegenwart von 10 mM Glutamin die Insulinsekretion in der Kontrollphase höher als ohne Glutamin (von Minute 42-58 lagen die mittleren absoluten Sekretionsraten bei durchschnittlich 126 bzw. 96 pg Insulin/min·Insel). Durch Erhöhung der Glucosekonzentration von 10 mM auf 40 mM wurden sowohl mit als auch ohne Glutamin im Medium nach 10 Minuten etwa 175 pg Insulin/min·Insel freigesetzt (von Minute 65-102 lagen die mittleren absoluten Sekretionsraten bei durchschnittlich 174 bzw. 162 pg Insulin/min·Insel). Wie bei KIC als Testsubstanz war also Glutamin auch nicht in der Lage, unter den gewählten Versuchsbedingungen die Glucose-induzierte  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion zu steigern. Glutamin bewirkte lediglich ein erhöhtes Ausgangsniveau der Sekretion.



**Abb. 4.9**  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus- Pankreasinseln durch 40 mM Glucose in Abhängigkeit von Glutamin. Von Minute 1-104 enthielten die Perifusionsmedien 2,7  $\mu$ M Glipizid. Die Glucosekonzentration wurde ab Minute 61 von 10 mM auf 40 mM erhöht. Die Versuche fanden ohne (○) oder in Gegenwart von 10 mM Glutamin (●) statt (Minute 1-104). Dargestellt sind die freigesetzten absoluten Insulinsekretionsraten in pg/min·Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte + oder - SEM aus 4 Einzelexperimenten.

Bei der Durchführung von entsprechenden Versuchen mit 1 mM KIC als Testsubstanz (Abb. 4.10) lag das Sekretionsniveau in der Kontrollphase bei Anwesenheit von 10 mM Glutamin im Perifusionsmedium wesentlich höher (von Minute 42-58 lagen die mittleren absoluten Sekretionsraten bei durchschnittlich 218 im Vergleich zu 93 pg Insulin/min·Insel ohne Glutamin) als in den entsprechenden Versuchen der Abb. 4.8 und 4.9. Dies lag möglicherweise daran, dass in dieser Versuchsserie zufällig größere Pankreasinseln für die Perfusionen genutzt wurden. Durch das Zufügen von 1 mM KIC wurde die Insulinsekretion sowohl mit als auch ohne Glutamin nach 5 Minuten um 60 pg Insulin/min·Insel gesteigert. Auch bei diesen Versuchen konnte also durch Glutamin kein stärkerer oder länger anhaltender Anstieg der KIC-induzierten Sekretion verzeichnet werden. In Abb. 4.10 erscheint die Kurve mit Glutamin lediglich parallel nach oben verschoben im Vergleich zur Kurve ohne Glutamin.



**Abb. 4.10**  $K_{ATP}$ - Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus- Pankreasinseln durch 1 mM KIC in Abhängigkeit von Glutamin. Von Minute 1-104 enthielten die Perifusionsmedien 10 mM Glucose und 2,7  $\mu$ M Glipizid. 1 mM KIC wurde ab Minute 61 zugefügt. Die Versuche fanden ohne Glutamin (○) oder in Gegenwart von 10 mM Glutamin (●) statt (Minute 1-104). Dargestellt sind die freigesetzten absoluten Insulinsekretionsraten in pg/min · Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte - SEM aus 4 Einzelexperimenten.

#### 4.1.3 Steigerung der Insulinsekretion durch $\alpha$ -Ketocapronat (KC)

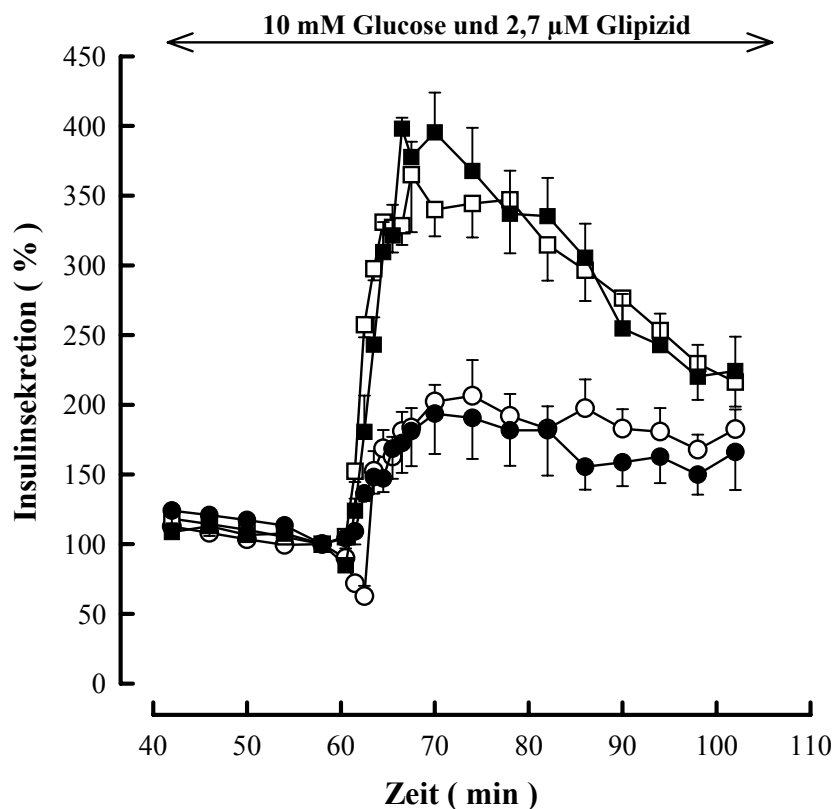
$\alpha$ -Ketocapronsäure (KC, Abb. 2.1) bewirkte eine ähnlich starke  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion wie ihr Isomer, die  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure. Das Zufügen von 20 mM KC zu einem Perifusionsmedium mit 10 mM Glucose und 2,7  $\mu$ M Glipizid führte nach 10 Minuten zu einer Steigerung der Sekretionsrate auf 350 % (Abb. 4.11).

#### 4.1.4 Steigerung der Insulinsekretion durch $\alpha$ -Ketoisovalerat (KIV)

$\alpha$ -Ketoisovaleriansäure (KIV, Abb. 2.1) gilt, im Gegensatz zu KIC und KC, in Abwesenheit von anderen Insulin-freisetzenden Substanzen nicht als ein Initiator der Insulinsekretion (PANTEN, 1975). Auch in Gegenwart von 10 mM Glucose und 2,7  $\mu$ M Glipizid führte KIV zu einem deutlich schwächeren  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effekt als KIC und KC (Abb. 4.11). Nach zehnminütiger Perifusion mit 20 mM KIV beobachtete man ein Ansteigen der Insulinsekretionsrate auf nur 190 %. Damit lag die Fähigkeit von 20 mM KIV zur Auslösung eines  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effektes in einem Bereich wie bei 1 mM KIC (Abb. 4.6).

Zum Vergleich mit der Wirksamkeit einer Erhöhung der Glucosekonzentration von 10 mM auf 40 mM ist die entsprechende Sekretionskurve aus Abb. 4.2 auch in Abb. 4.11 dargestellt.



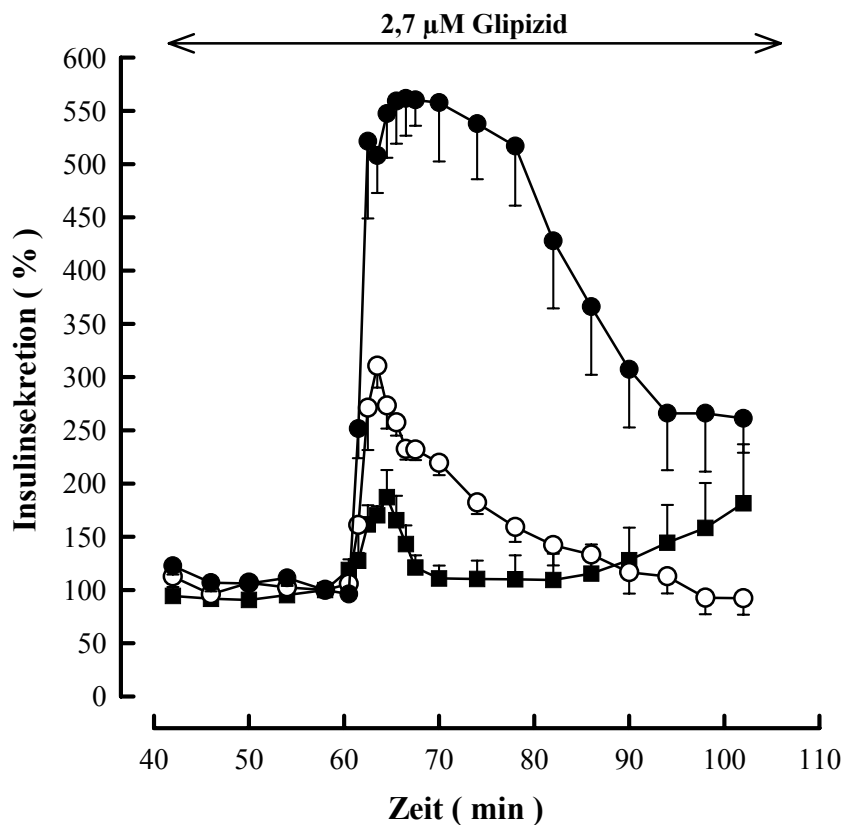


**Abb. 4.11**  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln durch Zugabe von 20 mM KIC (■), 20 mM KC (□), 20 mM KIV (●) oder 30 mM Glucose (○) zum Perifusionsmedium ab Minute 61. Die Medien enthielten 10 mM Glucose und 2,7 µM Glipizid von Minute 1-104. Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte + oder – SEM aus 4 Einzelexperimenten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 58) wurde auf 100 % gesetzt.

Enthielt das Perifusionsmedium keine Glucose, sondern nur 2,7 µM Glipizid, so konnte durch KIV keine lang andauernde  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion aufrecht erhalten werden (Abb. 4.12). 4 Minuten nach Zugabe von 20 mM KIV war die Sekretionsrate auf 310 % erhöht. Danach sank die Sekretionsrate bis zu Ende des Versuchs (Minute 102) wieder kontinuierlich auf das Ausgangsniveau (100 %) zurück.

20 mM KIC bewirkte auch ohne Glucose im Medium einen deutlich stärkeren und länger anhaltenden  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effekt als 20 mM KIV. Die Sekretionsrate wurde nach 6 Minuten auf 560 % gesteigert, sie blieb dann für weitere 14 Minuten auf einem hohen Niveau von über 500 % und sank bis zum Ende des Versuchs auf 250 % (Abb. 4.7, 4.12).

Zum Vergleich mit der Wirksamkeit von 40 mM Glucose ist die entsprechende Sekretionskurve aus Abb. 4.4 auch in Abb. 4.12 dargestellt.



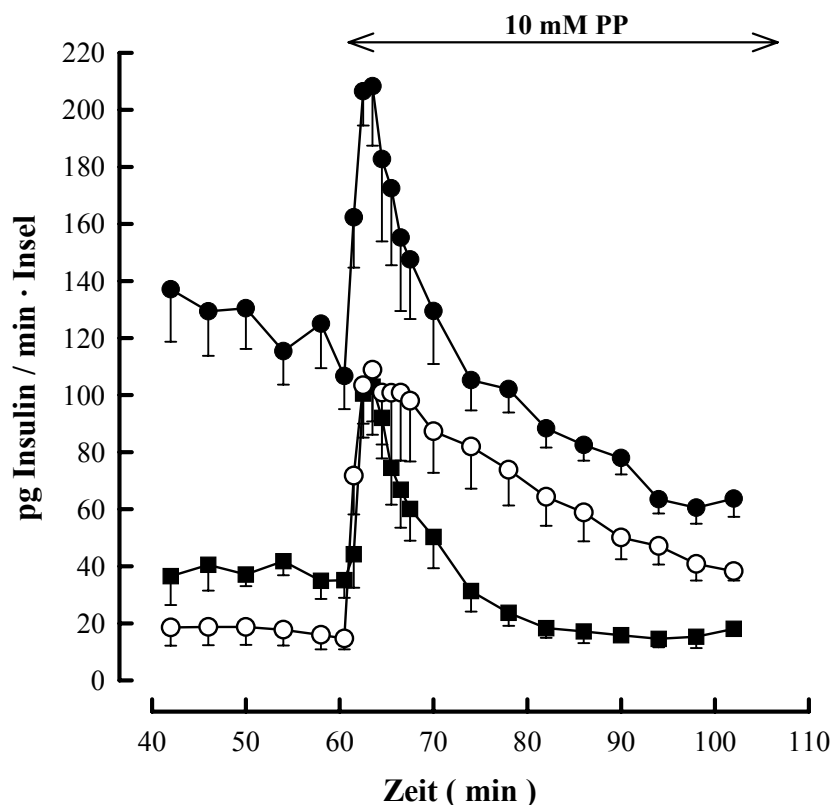
**Abb. 4.12**  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln durch Zugabe von 20 mM KIC (●), 20 mM KIV (○) oder 40 mM Glucose (■) zum Perifusionsmedium ab Minute 61. Die Medien enthielten 2,7  $\mu$ M Glipizid von Minute 1-104. Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte + oder - SEM aus 4-7 Einzelexperimenten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 58) wurde auf 100 % gesetzt.

#### 4.1.5 Steigerung der Insulinsekretion durch $\beta$ -Phenylpyruvat (PP)

$\beta$ -Phenylpyruvat (PP, Abb. 2.1) kann im Gegensatz zu Pyruvat (MERTZ et al., 1996) eine Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln bewirken, und dies ebenso wie KIC und KC auch in Abwesenheit von anderen Stimulatoren der Sekretion (MATSCHINSKY et al., 1975; LENZEN und PANTEN, 1981).

PP induzierte nur eine kurzzeitige und schwache  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion mit einer anderen Sekretionskinetik als die anderen Testsubstanzen unter vergleichbaren Bedingungen (Abb. 4.13). Bei Vorhandensein von 10 mM Glucose und 2,7  $\mu$ M Glipizid im Perifusionsmedium erhöhte sich die Sekretionsrate 4 Minuten nach Zufügen von 10 mM PP auf 171 % (Sekretionsrate bei Minute 58 = 100 %). Nach Erreichen dieses Maximalwertes sank die Sekretionsrate schnell ab auf 52 % bei Minute 102. Somit scheint die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion durch PP schließlich sogar gehemmt zu sein, denn die Sekretionsrate gegen Ende der Perifusion lag bei jedem einzelnen Versuch niedriger als bei Vergleichsversuchen ohne Testsubstanz. Bei diesen Vergleichsversuchen ohne PP sank die Sekretionsrate bis zum Ende des Versuchs (Minute 102) nur auf durchschnittlich 80 % (Abb. 4.2).

Die Durchführung entsprechender Versuche ohne Glucose im Perifusionsmedium führte zu einer parallel nach unten verschobenen Sekretionskurve (Abb. 4.13). Ohne Glucose



**Abb. 4.13** Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus- Pankreasinseln durch Zugabe von 10 mM PP zum Perifusionsmedium ab Minute 61. Von Minute 1-104 enthielt das Medium 10 mM Glucose und 2,7  $\mu$ M Glipizid (●), 10 mM Glucose (○) oder 2,7  $\mu$ M Glipizid (■). Dargestellt sind die freigesetzten absoluten Insulinsekretionsraten in pg/min·Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte - SEM aus 4 Einzelexperimenten.

im Medium lag das Ausgangsniveau der Sekretion bei jedem Einzelversuch mehr als dreimal niedriger als bei Anwesenheit von 10 mM Glucose (von Minute 42-58 lagen die mittleren absoluten Sekretionsraten bei durchschnittlich 38 bzw. 127 pg Insulin/min·Insel). Sowohl mit als auch ohne 10 mM Glucose im Medium erhöhte sich durch 10 mM PP die Insulinfreisetzung um etwa die gleiche Rate, nämlich um durchschnittlich 80 bzw. 70 pg Insulin/min·Insel nach 4 Minuten. Auch der sich anschließende schnelle Abfall der Sekretion auf Werte deutlich unterhalb des Ausgangsniveaus (100 %) verlief ähnlich wie bei den Versuchen mit 10 mM Glucose im Medium.

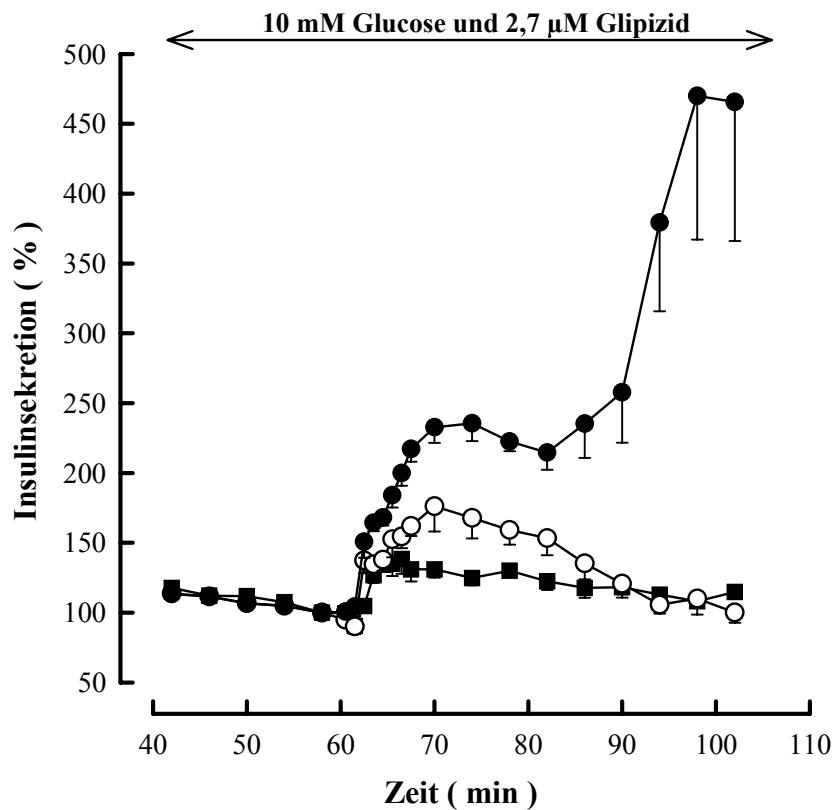
Fehlte im Perifusionsmedium nicht Glucose sondern Glipizid, so zeigte sich das Sekretionsprofil verändert (Abb. 4.13). Bei nur 10 mM Glucose im Kontrollmedium war die Sekretion in der Kontrollphase 50 % niedriger als bei Perifusion mit 2,7  $\mu$ M Glipizid (von Minute 42-58 lagen die mittleren absoluten Sekretionsraten bei durchschnittlich 18 bzw. 38 pg Insulin/min·Insel). Ohne Glipizid als  $K_{ATP}$ -Kanal blockierende Substanz kann PP eine Steigerung der Insulinsekretion auch noch durch zusätzliche Wirkung am  $K_{ATP}$ -Kanal ermöglichen (SCHMELING und PANTEN, 2002). Durch Zugabe von 10 mM PP wurde die Sekretionsrate nach 4 Minuten auf 790 % gesteigert. Im Unterschied zu den beiden Versuchsanordnungen mit Glipizid im Medium sank die Sekretion nach Erreichen dieses Maximalwertes weniger schnell ab auf 320 % bei Minute 102.

#### 4.1.6 Steigerung der Insulinsekretion durch (-)-b-BCH

(-)-b-BCH ((-)-b-2-Aminobicyclo[2.2.1]heptan-2-carbonsäure, Abb. 2.1) ist ein nicht metabolisierbares L-Leucin-Analogon, welches eine Insulinsekretion hervorrufen kann (CHRISTENSEN et al., 1971).

(-)-b-BCH bewirkte auch eine  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion. Das Hinzufügen von 20 mM BCH (entsprechend einer (-)-b-BCH-Konzentration von 9 mM, s. 3.1.2.3) zu einem 10 mM Glucose und 2,7  $\mu$ M Glipizid enthaltenden Perifusionsmedium erhöhte die Sekretionsrate nach 10 Minuten auf 175 %. Die Sekretionsrate sank danach bis zum Ende des Versuchs wieder auf 100 % (Abb. 4.14). Es ist bekannt, dass (-)-b-BCH allosterisch die Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) aktiviert (GYLFE, 1976), wodurch vermehrt Glutamat in  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt wird (Abb. 5.2). Damit Glutamat als Substrat für die GluDH nicht zum limitierenden Faktor der (-)-b-BCH-induzierten Insulinsekretion wurde, enthielten die Perifusionsmedien 10 mM Glutamin. Das B-Zell-membrangängige Glutamin wird durch Glutaminase zu Glutamat desaminiert.

Bei der Metabolisierung von KIC entsteht L-Leucin, welches ebenso wie (-)-b-BCH ein Aktivator der Glutamat-Dehydrogenase ist. Um zu prüfen, ob KIC durch L-Leucin-Bildung und somit durch GluDH-Aktivierung eine viel stärkere  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion auslöste als KIV, wurden Versuche mit (-)-b-BCH in Kombination mit KIV durchgeführt. Bei der Metabolisierung von KIV entsteht nicht L-Leucin, sondern L-Valin (Abb. 5.2). Anders als L-Leucin oder (-)-b-BCH aktiviert L-Valin die GluDH nicht (PANTEN und LANGER, 1981). Wenn die L-Leucin-Bildung aus KIC und die dadurch bedingte GluDH-Aktivierung der Grund für die im Vergleich zur KIV-Wirkung weitaus stärkere Insulin-freisetzende Wirkung von KIC wäre, dann müsste die KIV-induzierte Insulinsekretion durch die Kombination mit (-)-b-BCH so stark sein wie die KIC-induzierte Insulinsekretion. Die Versuche ergaben, dass die Kombination von 20 mM KIV mit 20 mM BCH (entsprechend 9 mM (-)-b-BCH, s. 3.1.2.3) nach 10 Minuten zu einem Anstieg der Sekretion auf 235 % führte, was in etwa einem additiven Effekt der Einzelwirkungen von 20 mM KIV und 9 mM (-)-b-BCH entsprach (Abb. 4.14). Durch gleichzeitige Applikation von KIV und (-)-b-BCH zum Perifusionsmedium konnte also nicht die sehr starke Fähigkeit von KIC zur Auslösung einer  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion imitiert werden. Überraschenderweise begann die Sekretionsrate nach 20-minütiger Perifusion mit KIV und (-)-b-BCH bzw. nach Erreichen der ersten Plateauphase bei 230 % weiter anzusteigen auf etwa 470 % bei Minute 102 (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14**  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln durch Zugabe von 20 mM BCH (○; entsprechend 9 mM (-)-b-BCH, s. 3.1.2.3), 20 mM BCH (entsprechend 9 mM (-)-b-BCH) + 20 mM KIV (●) oder 10 mM MMS (■) zum Perifusionsmedium ab Minute 61. Die Medien enthielten 10 mM Glucose und 2,7 µM Glipizid von Minute 1-104. Bei Perfusionen mit 20 mM BCH (○) enthielt das Medium zusätzlich 10 mM Glutamin von Minute 1-104. Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten.

Angegeben sind die Mittelwerte - SEM (falls größer als das Symbol) aus 4-8 Einzelexperimenten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 58) wurde auf 100 % gesetzt.

#### 4.1.7 Steigerung der Insulinsekretion durch Monomethylsuccinat (MMS)

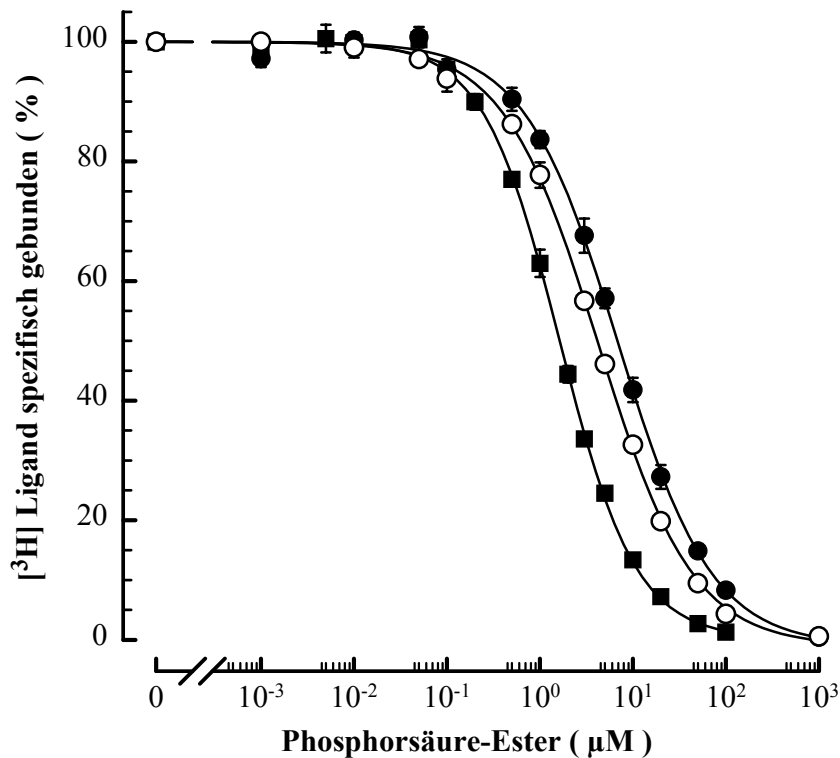
Monomethylsuccinat (MMS, Abb. 2.1) ist eine zellmembrangängige Vorstufe von Succinat, einem Intermediat des Citratzyklus. Der Methylester wird intrazellulär durch Esterasen zu Succinat hydrolysiert. MMS, nicht aber Succinat übt einen  $\beta$ -zytotropen Effekt auf Pankreasinseln von Ratten aus (MACDONALD und FAHIEN, 1988).

Der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Effekt von MMS erwies sich als schwach ausgeprägt. Durch Zugabe von 10 mM MMS zu einem Perifusionsmedium, welches 10 mM Glucose und 2,7 µM Glipizid enthielt, wurde die Insulinsekretionsrate nach 5 Minuten auf 130 % gesteigert (Abb. 4.14).

## 4.2 Interaktion von Sulfonylharnstoffen und Analoga mit $K_{ATP}$ -Kanälen bzw. SUR-Subtypen

### 4.2.1 Sulfonylharnstoff-Analogon mit einer Phosphatgruppe als anionischer Funktion

Eine anionische Gruppe wie das Sulfonylharnstoff-Element im Glibenclamid-Molekül oder die Carboxylgruppe im Meglitinid (Abb. 1.5 B, D) begünstigt die Wechselwirkung von Sulfonylharnstoffen und Analoga mit Sulfonylharnstoff-Rezeptoren (MEYER et al., 1999). Es sollte geprüft werden, ob dies auch für eine Phosphatgruppe als anionische Gruppe gilt. {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat (Abb. 2.3 A) entspricht strukturell dem Benzoessäure-Derivat Meglitinid mit der Ausnahme, dass es anstelle einer Carboxylfunktion über eine mit Phosphorsäure veresterte Hydroxylgruppe verfügt. In kompetitiven Bindungsstudien wurde die Affinität des Phosphorsäure-Esters für die Bindung an Membranen von COS1-Zellen, die SUR1, SUR2A oder SUR2B exprimierten, untersucht (Abb. 4.15). Die Bindung von [ $^3$ H]Glibenclamid an SUR1 wurde halbmaximal bei  $1,63 \pm 0,07 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 1,06 \pm 0,03$ ) gehemmt. [ $^3$ H]P1075 wurde bei einer Konzentration von  $7,01 \pm 0,54 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 0,87 \pm 0,03$ ) halbmaximal aus seiner Bindung an SUR2A verdrängt. Aus seiner Bindung an SUR2B wurde [ $^3$ H]P1075 halbmaximal bei einer Konzentration von  $4,21 \pm 0,19 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 0,89 \pm 0,04$ ) verdrängt. Aus diesen halbmaximal-inhibitorischen Konzentrationen ( $IC_{50}$ ), den freien Konzentrationen von [ $^3$ H]Glibenclamid bzw. [ $^3$ H]P1075 sowie den Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) von Glibenclamid ( $0,55 \text{ nM}$ ; DÖRSCHNER et al., 1999) bzw. P1075 ( $46 \text{ nM}$  für SUR2A,  $12 \text{ nM}$  für SUR2B; SCHWANSTEDT et al., 1998) wurden nach CHENG und PRUSOFF (1973) die folgenden Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) für die Bindung von {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat an SUR errechnet:  $1,06 \pm 0,04 \mu\text{M}$  (SUR1),  $6,58 \pm 0,50 \mu\text{M}$  (SUR2A) und  $3,37 \pm 0,15 \mu\text{M}$  (SUR2B) (Tab. 4.1). Der  $K_D$ -Wert für SUR1 erwies sich als signifikant kleiner als der  $K_D$ -Wert für SUR2A oder SUR2B. Die gefundenen Affinitäten des Phosphorsäure-Esters für die Bindung an SUR1 bzw. an die SUR2-Subtypen lagen niedriger bzw. im ähnlichen Bereich wie die von Meglitinid. Für Meglitinid als Benzoessäure-Derivat wurden die folgenden  $K_D$ -Werte ermittelt:  $6,81 \pm 0,48 \mu\text{M}$  (SUR1),  $7,63 \pm 0,62 \mu\text{M}$  (SUR2A) und  $7,20 \pm 0,33 \mu\text{M}$  (SUR2B) (Tab. 4.1; MEYER et al., 1999).

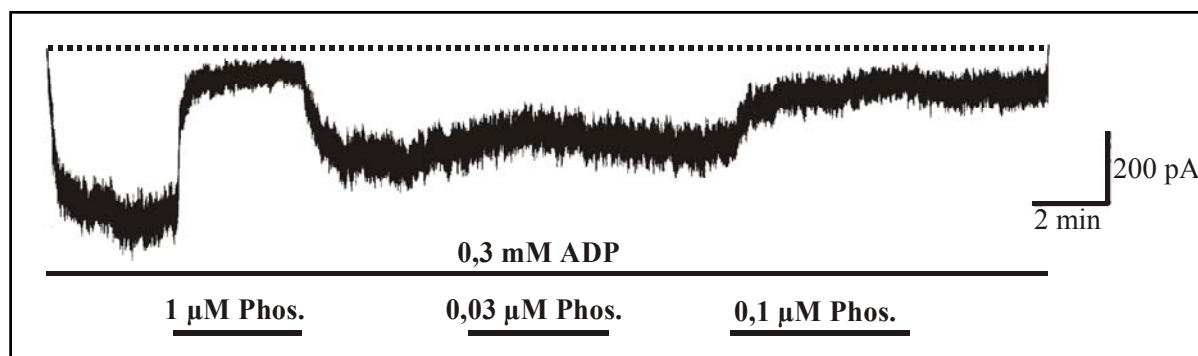


**Abb. 4.15** Einfluss von {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat auf die [<sup>3</sup>H]Ligand-Bindung an Membranen von SUR1 (■), SUR2A (●) oder SUR2B (○) exprimierenden COS1-Zellen. Die Bindung von 0,3 nM [<sup>3</sup>H]Glibenclamid an Membranen mit SUR1 wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die 5 µg/ml Membranprotein und die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die Bindung von 3 nM [<sup>3</sup>H]-P1075 an Membranen mit SUR2A oder SUR2B

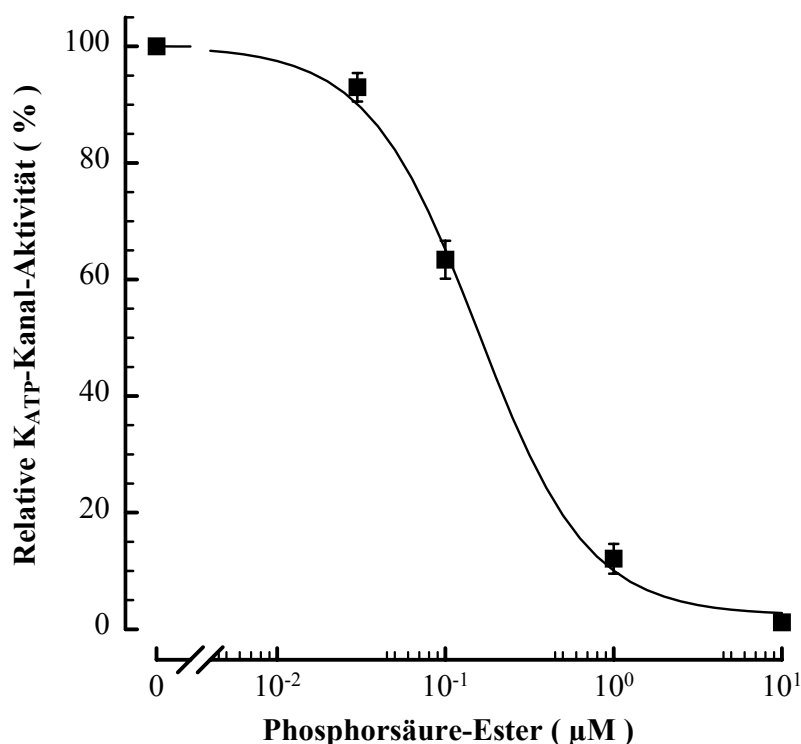
wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die 30-70 µg/ml Membranprotein, 100 µM MgATP, 1 mM freies Mg<sup>2+</sup> sowie die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die un-spezifische Bindung wurde durch parallele Inkubationen in Gegenwart von 100 nM nicht-markiertem Glibenclamid bzw. 100 µM nicht-markiertem Pinacidil definiert. Die Ergebnisse sind aufgeführt in Prozent der spezifischen [<sup>3</sup>H]Ligand-Bindung in Abwesenheit hemmender Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (falls größer als das Symbol) aus 4-6 Einzelexperimenten.

Der Ablauf eines typischen Patch-Clamp-Experimentes in der Inside-out-Konfiguration mit {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat ist in Abb. 4.16 dargestellt. Bei einem Pipettenpotential von 50 mV wurden Einwärtsströme gemessen, die als abwärts gerichtete Auslenkungen aufgeführt sind. 0,1 µM bzw. 1 µM des Phosphorsäure-Esters führte in Gegenwart von 0,3 mM ADP zu einer Abnahme der SUR1/K<sub>IR</sub>6.2-Kanal-Aktivität auf 60 % bzw. 10 %.

Abb. 4.17 zeigt die konzentrationsabhängige Wirkung von {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat auf SUR1/K<sub>IR</sub>6.2-Kanäle im Patch-Clamp-Experiment. In Anwesenheit von 0,3 mM ADP wurde die Kanal-Aktivität halbmaximal bei 0,16 µM gehemmt (Hillkoeffizient n = 1,33). Dieser EC<sub>50</sub>-Wert war somit 6,6fach niedriger als der K<sub>D</sub>-Wert für die Bindung an SUR1. Dies passt gut zu der allgemeinen Beobachtung, dass die K<sub>D</sub>-Werte aus Bindungsexperimenten drei- bis sechsfach größer sind als die EC<sub>50</sub>-Werte aus Patch-Clamp-Experimenten, weil die Besetzung einer der vier Sulfonylharnstoff-Bindungsstellen eines K<sub>ATP</sub>-Kanals zur Blockade des Kanals ausreicht (DÖRSCHNER et al., 1999).



**Abb. 4.16** Einfluss von {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat (Phos.) auf die Aktivität von SUR1/K<sub>IR</sub>6.2-Kanälen in Gegenwart von 0,3 mM ADP. Schnellschreiberregistrierung von Strömen durch K<sub>ATP</sub>-Kanäle in der Inside-out-Konfiguration. Die horizontalen Balken unter der Registrierung geben jeweils Auskunft über die Konzentration der eingesetzten Substanzen und die zeitliche Länge der einzelnen Test- und Kontrollphasen. Die gepunktete Linie entspricht dem Stromfluss bei 1 mM ATP (K<sub>ATP</sub>-Kanäle geschlossen).

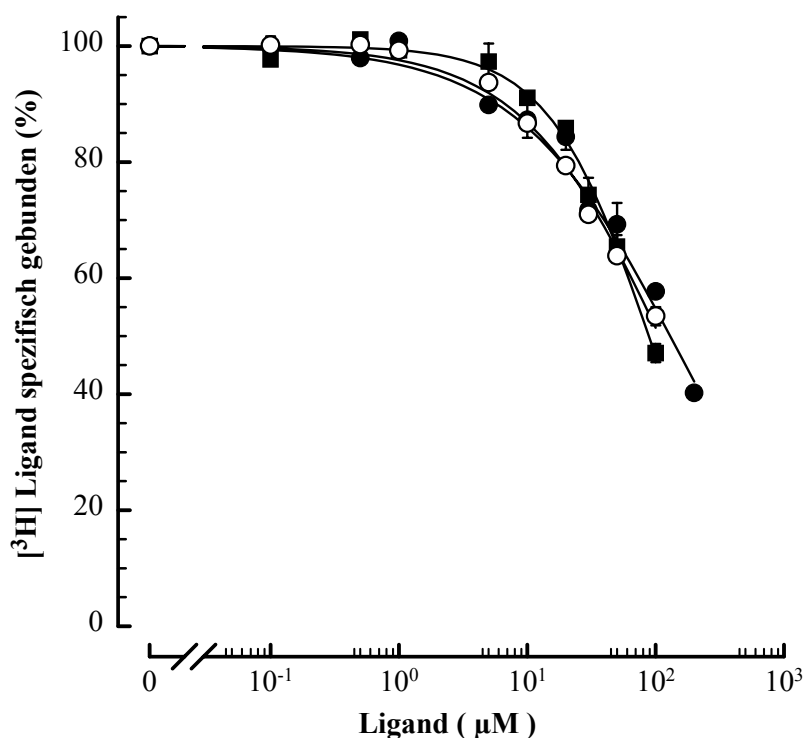


**Abb. 4.17** Einfluss von {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat auf die SUR1/K<sub>IR</sub>6.2-Kanal-Aktivität in Gegenwart von 0,3 mM ADP. Dargestellt ist die relative K<sub>ATP</sub>-Kanal-Aktivität (Inside-out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik) in Prozent in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (falls größer als das Symbol) aus 6 Einzelexperimenten.

MEYER et al. (1999) haben anhand eines Meglitinid-Derivats mit Methylgruppe anstelle der Carboxylgruppe gezeigt, dass durch das Fehlen einer anionischen Gruppe die Affinität für die Bindung an Sulfonylharnstoff-Rezeptoren stark reduziert ist. Durch Hydrolyse von {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat entsteht 5-Chlor-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-2-methoxybenzamid (Abb. 2.3 B), also ein Meglitinid-Abkömmling mit einer Hydroxyl- anstelle einer Carboxylfunktion. Diese phenolische Verbindung liegt aufgrund



ihres  $pK_s$ -Wertes von etwa 10 bei einem pH-Wert von 7,40 praktisch vollständig undissoziiert vor, so dass also unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine anionische Gruppe vorlag. Erwartungsgemäß zeigte dieses phenolische Meglitinid-Derivat eine geringe Rezeptoraffinität (Abb. 4.18). In kompetitiven Bindungsstudien wurde die Bindung von [ $^3$ H]Glibenclamid an SUR1 halbmaximal bei  $89,6 \pm 5,67 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 1,11 \pm 0,04$ ) gehemmt. [ $^3$ H]P1075 wurde bei einer Konzentration von  $149 \pm 2,91 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 0,82 \pm 0,10$ ) halbmaximal aus seiner Bindung an SUR2A verdrängt. Aus seiner Bindung an SUR2B wurde [ $^3$ H]P1075 halbmaximal bei einer Konzentration von  $120 \pm 9,10 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 0,80 \pm 0,02$ ) verdrängt. Aus diesen halbmaximal-inhibitorischen Konzentrationen wurden nach CHENG und PRUSOFF (1973) folgende Dissoziationskonstanten ( $K_D$ -Werte) errechnet:  $58,0 \pm 3,68 \mu\text{M}$  für die Bindung an SUR1,  $140 \pm 2,73 \mu\text{M}$  für die Bindung an SUR2A und  $95,8 \pm 7,28 \mu\text{M}$  für die Bindung an SUR2B (Tab. 4.1).



**Abb. 4.18** Einfluss von 5-Chlor- N- [2- (4-hydroxyphenyl) ethyl]-2-methoxybenzamid auf die [ $^3$ H]Ligand- Bindung an Membranen von SUR1 (■), SUR2A (●) oder SUR2B (○) exprimierenden COS1- Zellen. Die Bindung von 0,3 nM [ $^3$ H]Glibenclamid an Membranen mit SUR1 wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die 5 µg/ml Membranprotein und die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die Bindung von 3 nM [ $^3$ H]-P1075 an Membranen mit SUR2A oder SUR2B

wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die 30-70 µg/ml Membranprotein, 100 µM MgATP, 1 mM freies  $\text{Mg}^{2+}$  sowie die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die unspezifische Bindung wurde durch parallele Inkubationen in Gegenwart von 100 nM nicht-markiertem Glibenclamid bzw. 100 µM nicht-markiertem Pinacidil definiert. Die Ergebnisse sind aufgeführt in Prozent der spezifischen [ $^3$ H]Ligand-Bindung in Abwesenheit hemmender Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (falls größer als das Symbol) aus 3-6 Einzelexperimenten.

Substanz	SUR1	SUR2A	SUR2B
	K <sub>D</sub> [μM]	K <sub>D</sub> [μM]	K <sub>D</sub> [μM]
Phos.	1,06 ± 0,04 *	6,58 ± 0,50	3,37 ± 0,15
Meglitinid	6,81 ± 0,48 <sup>a</sup>	7,63 ± 0,62 <sup>a</sup>	7,20 ± 0,33 <sup>a</sup>
Phenol.	58,0 ± 3,68	140 ± 2,73	95,8 ± 7,28

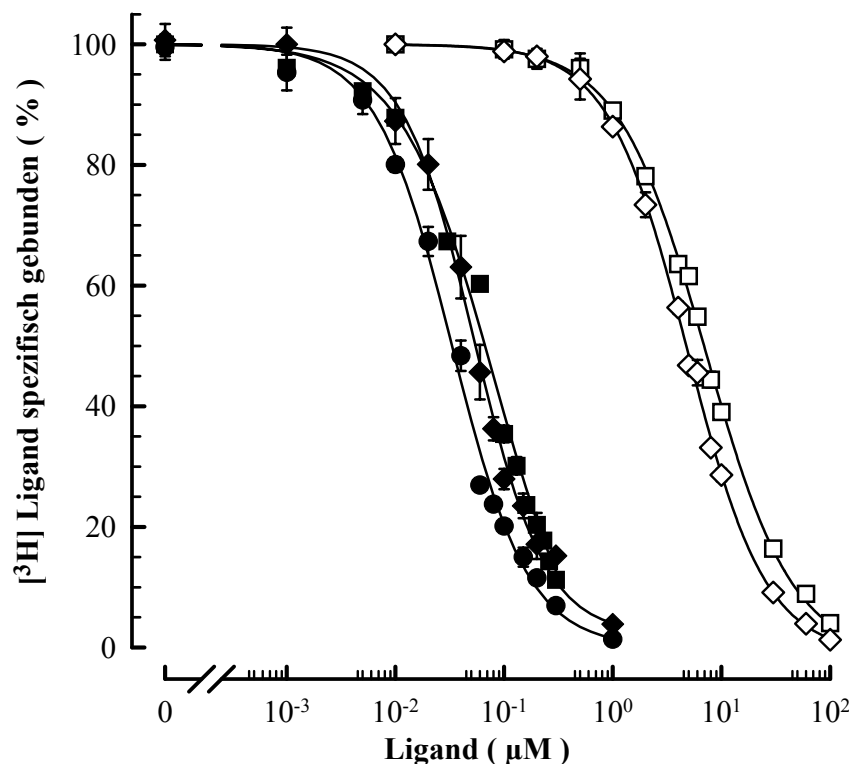
**Tab. 4.1** Vergleich der K<sub>D</sub>-Werte von {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat (Phos.), Meglitinid und 5-Chlor-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-2-methoxybenzamid (Phenol.) für die Bindung an Sulfonylharnstoffrezeptor-Subtypen. Die K<sub>D</sub>-Werte wurden nach CHENG und PRUSOFF (1973) unter Verwendung der in Bindungsexperimenten ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte sowie der K<sub>D</sub>-Werte von Glibenclamid (0,55 nM; DÖRSCHNER et al., 1999) oder P1075 (46 nM für SUR2A, 12 nM für SUR2B; SCHWANSTECHE et al., 1998) und den freien [<sup>3</sup>H]Ligand-Konzentrationen berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus jeweils 3-6 Einzelexperimenten. <sup>a</sup> Werte aus MEYER et al., 1999. \* P < 0,01 (Vergleich zu SUR2A).

#### 4.2.2 Repaglinid und Analoga

Repaglinid ((+)-2-Ethoxy-4-{2-[[3-methyl-1-[2-(1-piperidiny)phenyl]butyl]amino]-2-oxoethyl}-benzoesäure, Abb. 2.4) ist der erste Vertreter der sogenannten prandialen Glucoseregulatoren, der in Deutschland seit 1998 als orales Antidiabetikum (NovoNorm®) zugelassen ist. Repaglinid als Benzoesäure-Derivat bewirkt eine Insulinsekretion durch eine Blockade von K<sub>ATP</sub>-Kanälen der B-Zelle. Es ist jedoch noch ungeklärt, ob Repaglinid an die Glibenclamid-Bindungsstelle bindet oder über eine eigene Bindungsstelle am SUR verfügt (FUHLENDORFF et al., 1998; HU et al., 2000). In kompetitiven Bindungsstudien wurde die Affinität von Repaglinid für die Bindung an Membranen von COS1-Zellen, die SUR1, SUR2A oder SUR2B exprimierten, untersucht (Abb. 4.19). Die Bindung von [<sup>3</sup>H]Glibenclamid an SUR1 wurde halbmaximal bei 77,9 ± 3,36 nM (Hillkoeffizient n = 1,03 ± 0,02) gehemmt. [<sup>3</sup>H]P1075 wurde bei einer Konzentration von 53,2 ± 4,52 nM (Hillkoeffizient n = 1,28 ± 0,03) halbmaximal aus seiner Bindung an SUR2A verdrängt. Aus seiner Bindung an SUR2B wurde [<sup>3</sup>H]P1075 halbmaximal bei einer Konzentration von 58,2 ± 6,50 nM (Hillkoeffizient n = 1,03 ± 0,01) verdrängt. Aus diesen halbmaximal-inhibitorischen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>) wurden nach CHENG und PRUSOFF (1973) die folgenden K<sub>D</sub>-Werte für die Bindung von Repaglinid an SUR errechnet: 50,5 ± 2,18 nM (SUR1), 50,0 ± 4,25 nM (SUR2A), 46,6 ± 5,23 nM (SUR2B). Repaglinid zeigte also zu allen 3 Rezeptor-Subtypen die gleiche Affinität (Tab. 4.2).

AG-EE 624 ZW ((-)-2-Ethoxy-4-{2-[[3-methyl-1-[2-(1-piperidiny) phenyl] butyl] amino]-2-oxoethyl}-benzoesäure, Abb. 2.4) ist das R-Enantiomer des Repaglinids. AG-EE 624 ZW verdrängte [<sup>3</sup>H]Glibenclamid halbmaximal aus seiner Bindung an SUR1 bei einer Konzentration von 7,13 ± 0,20 μM (Hillkoeffizient n = 1,08 ± 0,03) (Abb. 4.19). Der sich aus

diesem  $IC_{50}$ -Wert ergebende  $K_D$ -Wert lag bei  $4,61 \pm 0,13 \mu M$ . Die Bindung von  $[^3H]P1075$  an SUR2A wurde halbmaximal bei  $4,91 \pm 0,20 \mu M$  (Hillkoeffizient  $n = 1,20 \pm 0,06$ ) gehemmt. Aus diesem  $IC_{50}$ -Wert errechnete sich eine Dissoziationskonstante von  $4,61 \pm 0,19 \mu M$  (Tab. 4.2). In jedem Einzelversuch war der  $K_D$ -Wert für AG-EE 624 ZW höher als der von Repaglinid. AG-EE 624 ZW wies somit eine 100fach geringere Affinität zu SUR1 und SUR2A auf als Repaglinid.

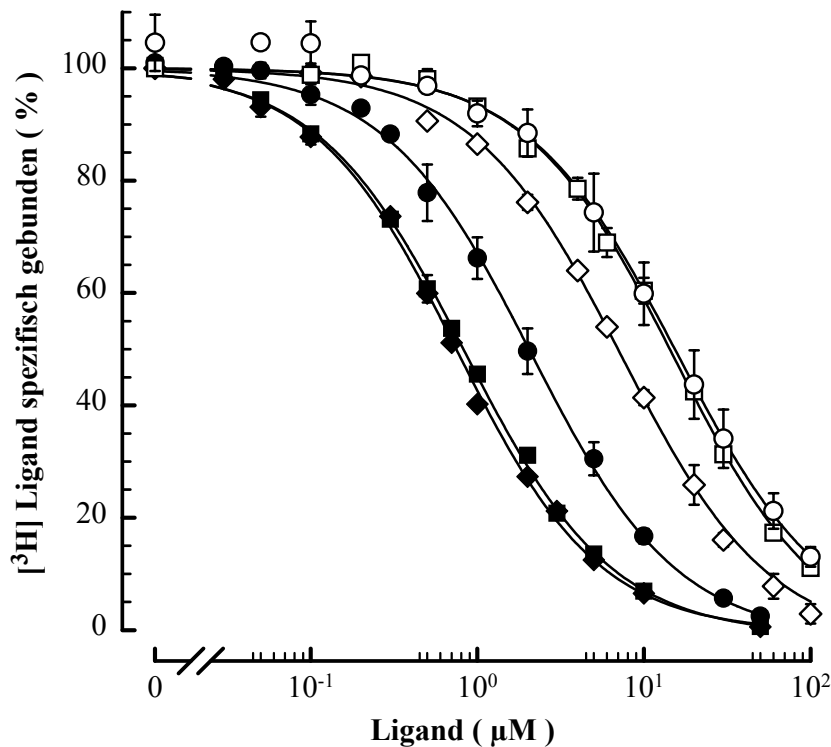


**Abb. 4.19** Einfluss von Repaglinid (■, ◆, ●) und AG-EE 624 ZW (□, ◇) auf die  $[^3H]$ Ligand-Bindung an Membranen von SUR1 (■, □), SUR2A (◆, ◇) oder SUR2B (●) exprimierenden COSI-Zellen. Die Bindung von 0,3 nM  $[^3H]$ Glibenclamid an Membranen mit SUR1 wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die 5  $\mu g/ml$  Membranprotein und die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die Bindung von 3 nM  $[^3H]$ -P1075 an Membranen mit SUR2A oder SUR2B wurde in Inkubationsan-

sätzen gemessen, die 30-70  $\mu g/ml$  Membranprotein, 100  $\mu M$  MgATP, 1 mM freies  $Mg^{2+}$  sowie die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die unspezifische Bindung wurde durch parallele Inkubationen in Gegenwart von 100 nM nicht-markiertem Glibenclamid bzw. 100  $\mu M$  nicht-markiertem Pinacidil definiert. Die Ergebnisse sind aufgeführt in Prozent der spezifischen  $[^3H]$ Ligand-Bindung in Abwesenheit hemmender Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (falls größer als das Symbol) aus 4 Einzelexperimenten.

Auch AG-EE 319 ZW ((+)-4-{2-[[1-[2-(1-Piperidinyl)phenyl]butyl]amino]-2-oxoethyl}-benzoesäure, Abb. 2.4) und AG-EE 436 ZW ((-)-4-{2-[[1-[2-(1-Piperidinyl)phenyl]butyl]amino]-2-oxoethyl}-benzoesäure, Abb. 2.4) sind ein Enantiomeren-Paar. Sie unterscheiden sich strukturell von Repaglinid durch das Fehlen der Ethoxygruppe am Ring B und durch das Vorhandensein einer Propyl- anstelle der Isobutylgruppe an der die Ringe A und B verbindenden Seitenkette. Auch hier unterschieden sich S- und R-Enantiomer hinsichtlich ihrer SUR-Affinität, wenngleich weniger deutlich als bei Repaglinid und AG-EE 624 ZW (Tab. 4.2). AG-EE 319 ZW (S-Enantiomer) verdrängte  $[^3H]$ Glibenclamid aus seiner SUR1-

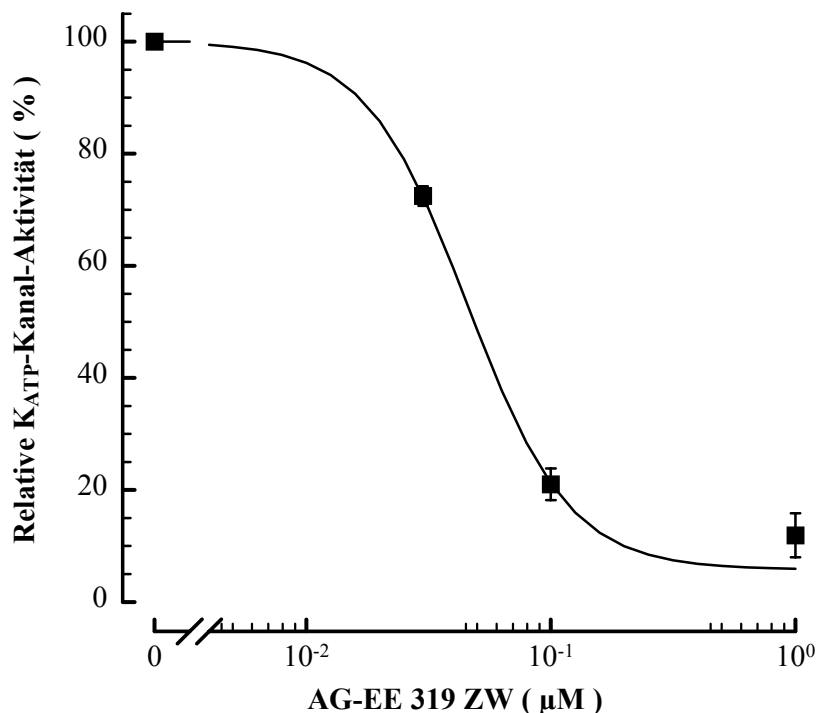
Bindung halbmaximal bei  $0,85 \pm 0,04 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 1,00 \pm 0,02$ ), während der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von AG-EE 436 ZW (R-Enantiomer) für die Verdrängung von  $[^3\text{H}]$ Glibenclamid an SUR1 bei  $15,2 \pm 0,97 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 1,00 \pm 0,02$ ) lag (Abb. 4.20). Die errechneten  $K_D$ -Werte betrugen  $0,55 \pm 0,03 \mu\text{M}$  bzw.  $9,87 \pm 0,63 \mu\text{M}$ . AG-EE 319 ZW verdrängte  $[^3\text{H}]$ P1075 halbmaximal aus seiner Bindung an SUR2A bei einer Konzentration von  $0,75 \pm 0,02 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 1,02 \pm 0,02$ ), während AG-EE 436 ZW dies bei einer Konzentration von  $7,25 \pm 0,19 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 0,98 \pm 0,03$ ) bewirkte (Abb. 4.20). Als  $K_D$ -Werte ergaben sich  $0,71 \pm 0,02 \mu\text{M}$  bzw.  $6,81 \pm 0,18 \mu\text{M}$ . Die Bindung von  $[^3\text{H}]$ P1075 an SUR2B wurde durch AG-EE 319 ZW halbmaximal bei  $2,20 \pm 0,27 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 1,00 \pm 0,01$ ) und durch AG-EE 436 ZW halbmaximal bei  $17,0 \pm 4,13 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 1,00 \pm 0,02$ ) gehemmt (Abb. 4.20), was Dissoziationskonstanten von  $1,76 \pm 0,22 \mu\text{M}$  bzw.  $13,6 \pm 3,30 \mu\text{M}$  entsprach. In jedem Einzelversuch war der  $K_D$ -Wert für AG-EE 436 ZW höher als für AG-EE 319 ZW. AG-EE 319 ZW (S-Enantiomer) zeigte also eine um den Faktor 10 höhere Affinität zu allen SUR-Isoformen als AG-EE 436 ZW (R-Enantiomer) (Tab. 4.2).



**Abb. 4.20** Einfluss von AG-EE 319 ZW (■, ◆, ●) und AG-EE 436 ZW (□, ◇, ○) auf die  $[^3\text{H}]$ Ligand-Bindung an Membranen von SUR1 (■, □), SUR2A (◆, ◇) oder SUR2B (●, ○) exprimierenden COS1-Zellen. Die Bindung von  $0,3 \text{ nM}$   $[^3\text{H}]$ Glibenclamid an Membranen mit SUR1 wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die  $5 \mu\text{g/ml}$  Membranprotein und die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die Bindung von  $3 \text{ nM}$   $[^3\text{H}]$ -P1075 an Membranen mit SUR2A oder SUR2B

wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die  $30\text{--}70 \mu\text{g/ml}$  Membranprotein,  $100 \mu\text{M}$  MgATP,  $1 \text{ mM}$  freies  $\text{Mg}^{2+}$  sowie die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die unspezifische Bindung wurde durch parallele Inkubationen in Gegenwart von  $100 \text{ nM}$  nicht-markiertem Glibenclamid bzw.  $100 \mu\text{M}$  nicht-markiertem Pinacidil definiert. Die Ergebnisse sind aufgeführt in Prozent der spezifischen  $[^3\text{H}]$ Ligand-Bindung in Abwesenheit hemmender Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm \text{SEM}$  (falls größer als das Symbol) aus 4-5 Einzelexperimenten.

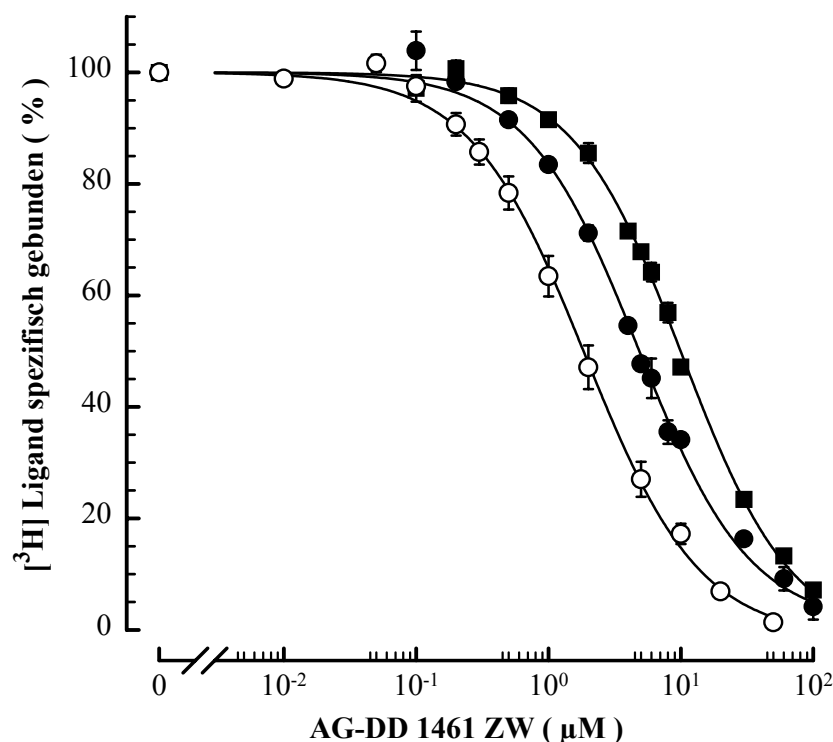
Im Patch-Clamp-Experiment (Abb. 4.21) in Anwesenheit von 0,3 mM ADP hemmte AG-EE 319 ZW die Aktivität von SUR1/K<sub>IR</sub>6.2-Kanälen halbmaximal bei 0,05  $\mu$ M (Hillkoeffizient  $n = 2,09$ ).



**Abb. 4.21** Einfluss von AG-EE 319 ZW auf die SUR1/ K<sub>IR</sub>6.2- Kanal- Aktivität in Gegenwart von 0,3 mM ADP. Dargestellt ist die relative K<sub>ATP</sub>- Kanal- Aktivität (Inside- out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik) in Prozent in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (falls größer als das Symbol) aus 4 Einzelexperimenten.

AG-DD 1461 ZW (4-{2-[[[2-(1-Piperidiny)phenyl]methyl]amino]-2-oxoethyl}-benzoesäure, Abb. 2.4) unterscheidet sich strukturell von Repaglinid durch das Fehlen der Ethoxygruppe am Ring B und der Isobutylgruppe an der die aromatischen Ringe A und B verbindenden Seitenkette. AG-DD 1461 ZW verdrängte [<sup>3</sup>H]Glibenclamid halbmaximal aus seiner Bindung an SUR1 bei einer Konzentration von  $10,3 \pm 0,42$   $\mu$ M (Hillkoeffizient  $n = 1,05 \pm 0,02$ ) (Abb. 4.22). Der sich aus diesem IC<sub>50</sub>-Wert ergebende K<sub>D</sub>-Wert lag bei  $6,68 \pm 0,27$   $\mu$ M. Die Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 an SUR2A und SUR2B wurde halbmaximal bei  $4,76 \pm 0,27$   $\mu$ M (Hillkoeffizient  $n = 1,05 \pm 0,02$ ) bzw.  $1,65 \pm 0,18$   $\mu$ M (Hillkoeffizient  $n = 1,00 \pm 0,01$ ) gehemmt (Abb. 4.22). Aus diesen IC<sub>50</sub>-Werten errechneten sich Dissoziationskonstanten von  $4,47 \pm 0,26$   $\mu$ M (SUR2A) bzw.  $1,32 \pm 0,15$   $\mu$ M (SUR2B). Die Affinitäten zu den SUR-Isoformen lagen damit in einem Bereich wie bei AG-EE 624 ZW (Tab. 4.2).

Sowohl Repaglinid als auch seine Analoga AG-EE 624 ZW und AG-EE 436 ZW zeigten zu den 3 Rezeptor-Isoformen immer eine ähnliche Affinität, d.h. eine Selektivität für eine der 3 SUR-Isoformen konnte nicht gezeigt werden (Tab. 4.2). Bei AG-EE 319 ZW bzw. AG-DD 1461 ZW war der K<sub>D</sub>-Wert für SUR2B signifikant höher bzw. grenzwertig niedriger als für SUR1 und SUR2A (Tab. 4.2).



**Abb. 4.22** Einfluss von AG-DD 1461 ZW auf die [ $^3\text{H}$ ]Ligand- Bindung an Membranen von SUR1 (■), SUR2A (●) oder SUR2B (○) exprimierenden COS1- Zellen. Die Bindung von 0,3 nM [ $^3\text{H}$ ]-Glibenclamid an Membranen mit SUR1 wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die 5  $\mu\text{g/ml}$  Membranprotein und die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die Bindung von 3 nM [ $^3\text{H}$ ]P1075 an Membranen mit SUR2A oder SUR2B wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die 30-70  $\mu\text{g/ml}$  Mem-

branprotein, 100  $\mu\text{M}$  MgATP, 1 mM freies  $\text{Mg}^{2+}$  sowie die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die unspezifische Bindung wurde durch parallele Inkubationen in Gegenwart von 100 nM nicht-markiertem Glibenclamid bzw. 100  $\mu\text{M}$  nicht-markiertem Pinacidil definiert. Die Ergebnisse sind aufgeführt in Prozent der spezifischen [ $^3\text{H}$ ]Ligand-Bindung in Abwesenheit hemmender Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (falls größer als das Symbol) aus 4 Einzelexperimenten.

Substanz	SUR1	SUR2A	SUR2B
	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]
Repaglinid	$0,05 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,01$
AG-EE 624 ZW	$4,61 \pm 0,13$	$4,61 \pm 0,19$	Nicht bestimmt
AG-EE 319 ZW	$0,55 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,02$	$1,76 \pm 0,22$ *
AG-EE 436 ZW	$9,87 \pm 0,63$	$6,81 \pm 0,18$	$13,6 \pm 3,30$
AG-DD 1461 ZW	$6,68 \pm 0,27$	$4,47 \pm 0,26$	$1,32 \pm 0,15$ **

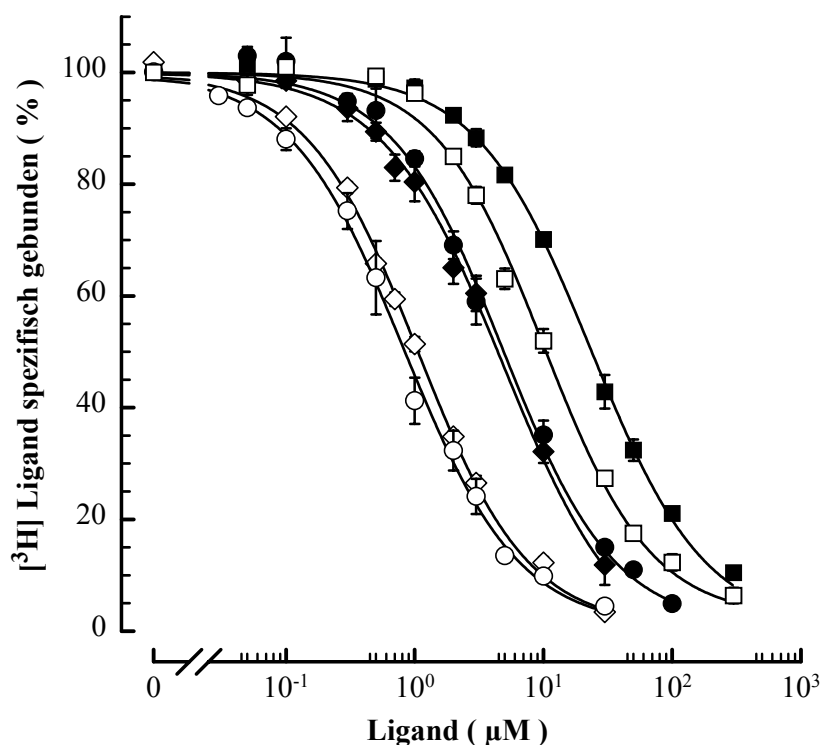
**Tab. 4.2** Vergleich der  $K_D$ -Werte von Repaglinid, AG-EE 624 ZW, AG-EE 319 ZW, AG-EE 436 ZW und AG-DD 1461 ZW für die Bindung an Sulfonylharnstoffrezeptor-Subtypen. Die  $K_D$ -Werte wurden nach CHENG und PRUSOFF (1973) unter Verwendung der in Bindungsexperimenten ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte sowie der  $K_D$ -Werte von Glibenclamid (0,55 nM; DÖRSCHNER et al., 1999) oder P1075 (46 nM für SUR2A, 12 nM für SUR2B; SCHWANSTECHER et al., 1998) und den freien [ $^3\text{H}$ ]Ligand-Konzentrationen berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus jeweils 4-5 Einzelexperimenten. \*  $P < 0,05$  (Vergleich zu SUR2A) \*\*  $P = 0,05$  (Vergleich zu SUR2A).

### 4.2.3 Sulfonylharnstoff-Derivate mit meta-ständiger Methyl(thio)harnstoff-Gruppe

Im Zuge der Entwicklung SUR2-selektiver Verbindungen wurde von GÖGELEIN et al. (1998) HMR 1883 (1- $\{[5-[2-(5\text{-Chlor-2-methoxybenzamido})\text{-ethyl}]-2\text{-methoxyphenyl}]\text{-sulfonyl}\}$ -3-methylthioharnstoff, Abb. 2.2) beschrieben, ein Glibenclamid-Derivat mit meta-Arrangement einer Sulfonylmethylthioharnstoff-Gruppe zur Ethylaminoseitenkette und einer Methoxygruppe in para-Stellung zur Ethylaminoseitenkette am Ring B. Ausgehend von HMR 1883 als Leitstruktur wurden weitere Verbindungen mit Strukturvariationen synthetisiert (ENGLERT et al., 2001), deren Bindungsaffinitäten in kompetitiven Bindungsstudien an Membranen von COS1-Zellen, die SUR1, SUR2A oder SUR2B exprimierten, bestimmt werden sollten.

S 920707 (1- $\{[5-[2-(5\text{-Chlor-2-methoxybenzamido})\text{-ethyl}]-2\text{-methoxyphenyl}]\text{-sulfonyl}\}$ -3-methylharnstoff, Abb. 2.5) unterscheidet sich von HMR 1883 durch das Vorhandensein einer Harnstoff- anstelle der Thioharnstoff-Gruppe. S 920707 hemmte die Bindung von  $[^3\text{H}]$ Glibenclamid an SUR1 halbmaximal bei  $24,2 \pm 1,75 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 0,97 \pm 0,02$ ). Die  $[^3\text{H}]$ P1075-Bindung an SUR2A wurde halbmaximal bei  $4,91 \pm 0,60 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 0,94 \pm 0,06$ ) gehemmt. Aus seiner Bindung an SUR2B verdrängte die Substanz  $[^3\text{H}]$ P1075 halbmaximal bei einer Konzentration von  $5,00 \pm 0,42 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 1,00 \pm 0,03$ ) (Abb. 4.23). Nach CHENG und PRUSOFF (1973) ergaben sich als Dissoziationskonstanten:  $15,6 \pm 1,13 \mu\text{M}$  (SUR1),  $4,61 \pm 0,56 \mu\text{M}$  (SUR2A) und  $4,00 \pm 0,33 \mu\text{M}$  (SUR2B) (Tab. 4.3). In jedem Einzelversuch war der  $K_D$ -Wert für SUR1 höher als die  $K_D$ -Werte für SUR2A oder SUR2B. S 920707 führte somit zu einer bevorzugten Bindung an die SUR2-Subtypen, unterschied aber nicht zwischen SUR2A und SUR2B.

HMR 1402 (1- $\{[5-[2-(5\text{-Chlor-2-methoxybenzamido})\text{-ethyl}]-2,4\text{-dimethoxyphenyl}]\text{-sulfonyl}\}$ -3-methylthioharnstoff, Abb. 2.5) ist wie HMR 1883 ein Thioharnstoff-Derivat. Es verfügt über eine zusätzliche Methoxygruppe in para-Stellung zur Sulfonylthioharnstoff-Gruppe am Ring B. Die Bindung von  $[^3\text{H}]$ Glibenclamid an SUR1 wurde halbmaximal bei  $10,2 \pm 0,62 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 1,01 \pm 0,01$ ) gehemmt.  $[^3\text{H}]$ P1075 wurde bei einer Konzentration von  $1,06 \pm 0,03 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 1,01 \pm 0,02$ ) halbmaximal aus seiner Bindung an SUR2A verdrängt. Aus seiner Bindung an SUR2B wurde  $[^3\text{H}]$ P1075 halbmaximal bei einer Konzentration von  $0,89 \pm 0,15 \mu\text{M}$  (Hillkoeffizient  $n = 0,98 \pm 0,02$ ) verdrängt (Abb. 4.23). Aus den erhaltenen  $\text{IC}_{50}$ -Werten wurden folgende  $K_D$ -Werte berechnet:  $6,59 \pm 0,40 \mu\text{M}$  (SUR1),  $0,99 \pm 0,03 \mu\text{M}$  (SUR2A) und  $0,71 \pm 0,12 \mu\text{M}$  (SUR2B) (Tab. 4.3). In jedem Einzelversuch war der  $K_D$ -Wert für SUR1 höher als die  $K_D$ -Werte für SUR2A oder SUR2B. Die Bevorzugung der Bindung an die SUR2-Subtypen erwies sich als stärker ausgeprägt als bei S 920707.

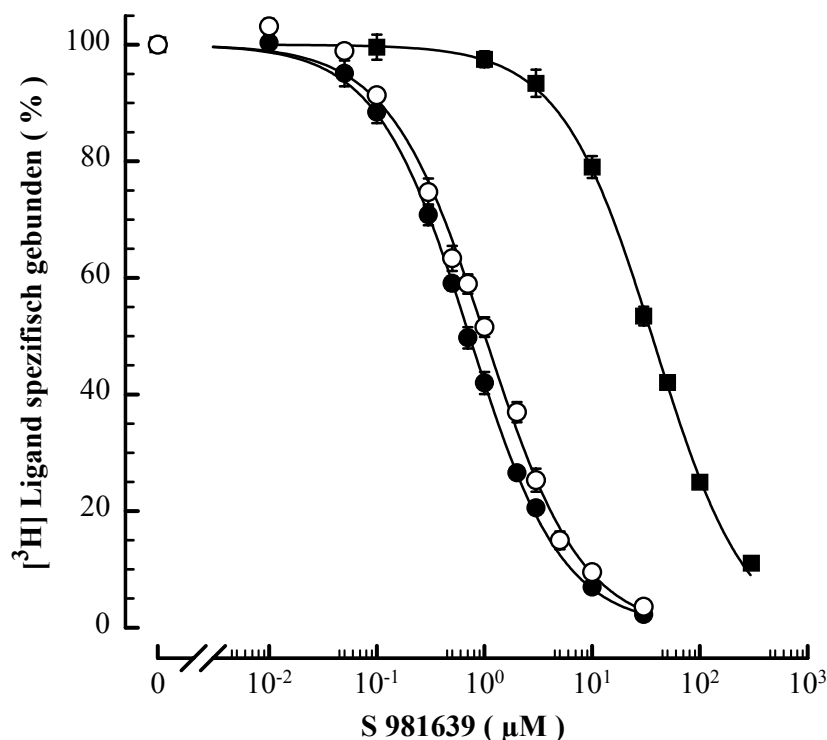


**Abb. 4.23** Einfluss von S 920707 (■, ◆, ●) und HMR 1402 (□, ◇, ○) auf die [<sup>3</sup>H]Ligand-Bindung an Membranen von SUR1 (■, □), SUR2A (◆, ◇) oder SUR2B (●, ○) exprimierenden COS1-Zellen. Die Bindung von 0,3 nM [<sup>3</sup>H]Glibenclamid an Membranen mit SUR1 wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die 5 µg/ml Membranprotein und die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die Bindung von 3 nM [<sup>3</sup>H]P1075 an Membranen mit SUR2A oder SUR2B wurde in Inkubationsansätzen

gemessen, die 30-70 µg/ml Membranprotein, 100 µM MgATP, 1 mM freies Mg<sup>2+</sup> sowie die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die unspezifische Bindung wurde durch parallele Inkubationen in Gegenwart von 100 nM nicht-markiertem Glibenclamid bzw. 100 µM nicht-markiertem Pinacidil definiert. Die Ergebnisse sind aufgeführt in Prozent der spezifischen [<sup>3</sup>H]Ligand-Bindung in Abwesenheit hemmender Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (falls größer als das Symbol) aus 4 Einzelexperimenten.

Auch S 981639 (1-{3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-N-[2-(4-(2-methoxyethoxy)-3-sulfamoylphenyl)ethyl]acrylamoyl}-3-methylthioharnstoff, Abb. 2.5) ist ein Thioharnstoff-Derivat. Der Unterschied zu S 920707 besteht des weiteren in einer Methoxyethoxy-Gruppe anstelle der zur Ethylaminoseitenkette para-ständigen Methoxygruppe am aromatischen Ring B. Außerdem ist die Kette zwischen den Ringen A und B um zwei C-Atome verlängert. S 981639 verdrängte in kompetitiven Bindungsstudien [<sup>3</sup>H]Glibenclamid aus seiner Bindung an SUR1 halbmaximal bei  $38,0 \pm 1,46$  µM (Hillkoeffizient  $n = 1,00 \pm 0,03$ ). Die Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 an SUR2A wurde halbmaximal bei  $0,73 \pm 0,03$  µM (Hillkoeffizient  $n = 1,01 \pm 0,01$ ) gehemmt. Aus seiner Bindung an SUR2B wurde [<sup>3</sup>H]P1075 halbmaximal bei einer S 981639-Konzentration von  $1,04 \pm 0,08$  µM (Hillkoeffizient  $n = 1,00 \pm 0,01$ ) verdrängt (Abb. 4.24). Nach CHENG und PRUSOFF (1973) ergaben sich aus den gemessenen IC<sub>50</sub>-Werten die folgenden Dissoziationskonstanten:  $24,6 \pm 0,94$  µM (SUR1),  $0,68 \pm 0,03$  µM (SUR2A) und  $0,83 \pm 0,07$  µM (SUR2B) (Tab. 4.3). In jedem Einzelversuch war der K<sub>D</sub>-Wert für SUR1 höher als die K<sub>D</sub>-Werte für SUR2A oder SUR2B. Die Bevorzugung der Bindung an die SUR2-Subtypen war viel stärker ausgeprägt als bei S 920707 und HMR 1402 (Tab. 4.3).





**Abb. 4.24** Einfluss von S 981639 auf die [<sup>3</sup>H]-Ligand-Bindung an Membranen von SUR1 (■), SUR2A (●) oder SUR2B (○) exprimierenden COS1- Zellen. Die Bindung von 0,3 nM [<sup>3</sup>H]Glibenclamid an Membranen mit SUR1 wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die 5 µg/ml Membranprotein und die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die Bindung von 3 nM [<sup>3</sup>H]-P1075 an Membranen mit SUR2A oder SUR2B wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die 30-70 µg/ml

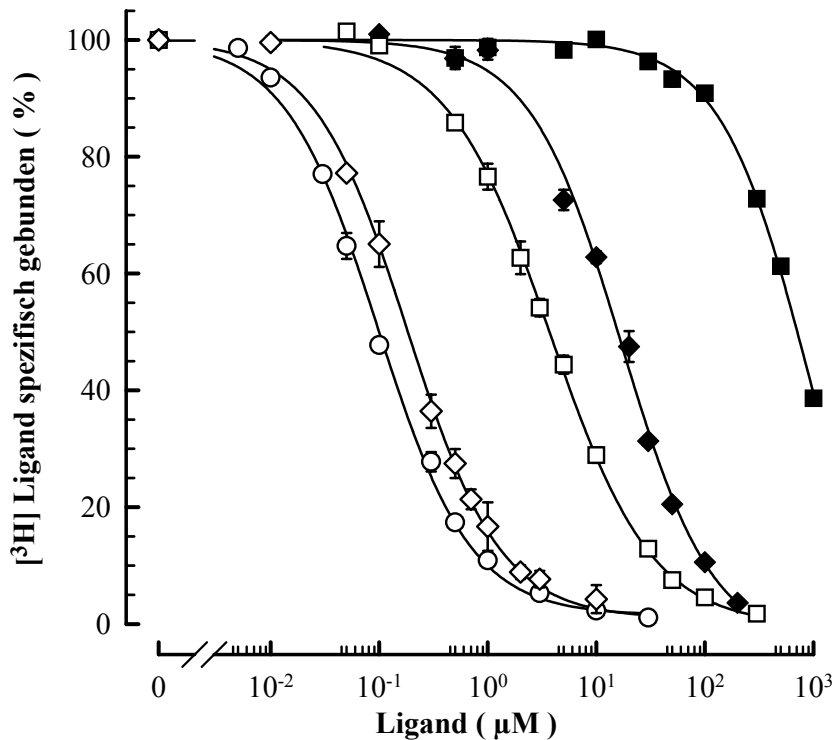
Membranprotein, 100 µM MgATP, 1 mM freies Mg<sup>2+</sup> sowie die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die unspezifische Bindung wurde durch parallele Inkubationen in Gegenwart von 100 nM nicht-markiertem Glibenclamid bzw. 100 µM nicht-markiertem Pinacidil definiert. Die Ergebnisse sind aufgeführt in Prozent der spezifischen [<sup>3</sup>H]Ligand-Bindung in Abwesenheit hemmender Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM (falls größer als das Symbol) aus 4 Einzelexperimenten.

SH 951729 ((+)-N-{[4-[(5-Chlor-2-methoxybenzamido)methyl]-7-methoxy-6-chromanyl]sulfonyl}-N-methylharnstoff, Abb. 2.5) und SH 951957 ((-)-N-{[4-[(5-Chlor-2-methoxybenzamido)methyl]-7-methoxy-6-chromanyl]sulfonyl}-N-methylharnstoff, Abb. 2.5) sind zwei Enantiomere, die wie S 981639 eine modifizierte Kette zwischen den aromatischen Ringen A und B aufweisen. Zwischen der im Vergleich zu S 920707 zu einer Methylamino-Einheit verkürzten Kette und dem Ring B ist ein Pyranring eingeschoben. Das (+)- und das (-)-Enantiomer unterschieden sich hinsichtlich ihrer SUR-Affinität (Abb. 4.25). SH 951729 ((+)-Enantiomer) verdrängte [<sup>3</sup>H]Glibenclamid aus seiner SUR1-Bindung halbmaximal bei  $955 \pm 59,0$  µM (Hillkoeffizient  $n = 1,05 \pm 0,04$ ), während der IC<sub>50</sub>-Wert von SH 951957 ((-)-Enantiomer) für die Verdrängung von [<sup>3</sup>H]Glibenclamid an SUR1 bei  $3,77 \pm 0,28$  µM (Hillkoeffizient  $n = 0,95 \pm 0,03$ ) lag. Die errechneten Dissoziationskonstanten betrugen  $618 \pm 38,2$  µM für die (+)-Verbindung und  $2,44 \pm 0,18$  µM für die (-)-Verbindung (Tab. 4.3). SH 951729 verdrängte [<sup>3</sup>H]P1075 halbmaximal aus seiner Bindung an SUR2A bei einer Konzentration von  $16,7 \pm 0,33$  µM (Hillkoeffizient  $n = 1,02 \pm 0,02$ ), während SH 951957 dies bei einer Konzentration von  $0,19 \pm 0,02$  µM (Hillkoeffizient  $n = 1,00 \pm 0,03$ ) bewirkte. Als K<sub>D</sub>-

Werte ergaben sich  $15,7 \pm 0,31 \mu\text{M}$  (SH 951729) bzw.  $0,17 \pm 0,02 \mu\text{M}$  (SH 951957). Die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{P1075}$  an SUR2B wurde durch SH 951957 halbmaximal bei  $97,1 \pm 5,94 \text{ nM}$  (Hillkoeffizient  $n = 0,99 \pm 0,01$ ) gehemmt, was einer Dissoziationskonstanten von  $77,7 \pm 4,75 \text{ nM}$  entsprach (Tab. 4.3).

Bei SH 951729 war in jedem Einzelversuch der  $K_D$ -Wert für die Bindung an SUR1 höher als der  $K_D$ -Wert für SUR2A. Die Bevorzugung der Bindung an SUR2A war viel stärker ausgeprägt als bei S 920707 und HMR 1402 (Tab. 4.3).

Bei SH 951957 war ebenfalls in jedem Einzelversuch der  $K_D$ -Wert für die Bindung an SUR1 höher als die  $K_D$ -Werte für SUR2A oder SUR2B. Die Bevorzugung der Bindung an die SUR2-Subtypen war stärker ausgeprägt als bei S 920707 und HMR 1402 (Tab. 4.3).



**Abb. 4.25** Einfluss von SH 951729 (■, ◆) und SH 951957 (□, ◇, ○) auf die  $[^3\text{H}]$ Ligand-Bindung an Membranen von SUR1 (■, □), SUR2A (◆, ◇) oder SUR2B (○) exprimierenden COSI- Zellen. Die Bindung von  $0,3 \text{ nM}$   $[^3\text{H}]$ -Glibenclamid an Membranen mit SUR1 wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die  $5 \mu\text{g/ml}$  Membranprotein und die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die Bindung von  $3 \text{ nM}$   $[^3\text{H}]\text{P1075}$  an Membranen mit SUR2A oder SUR2B wurde in Inkubationsansätzen gemessen, die  $30$ -

$70 \mu\text{g/ml}$  Membranprotein,  $100 \mu\text{M}$  MgATP,  $1 \text{ mM}$  freies  $\text{Mg}^{2+}$  sowie die angegebenen Konzentrationen der Substanz enthielten. Die unspezifische Bindung wurde durch parallele Inkubationen in Gegenwart von  $100 \text{ nM}$  nicht-markiertem Glibenclamid bzw.  $100 \mu\text{M}$  nicht-markiertem Pinacidil definiert. Die Ergebnisse sind aufgeführt in Prozent der spezifischen  $[^3\text{H}]$ Ligand-Bindung in Abwesenheit hemmender Substanzen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm \text{SEM}$  (falls größer als das Symbol) aus 4 Einzelexperimenten.

Substanz	SUR1 $K_D$ [ $\mu$ M]	SUR2A $K_D$ [ $\mu$ M]	SUR2B $K_D$ [ $\mu$ M]	$K_D$ (SUR1) / $K_D$ (SUR2A)
S 920707	$15,6 \pm 1,13$	$4,61 \pm 0,56$	$4,00 \pm 0,33$	3,38
HMR 1402	$6,59 \pm 0,40$	$0,99 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,12$	6,66
S 981639	$24,6 \pm 0,94$	$0,68 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,07$	36,2
SH 951729	$618 \pm 38,2$	$15,7 \pm 0,31$	Nicht bestimmt	39,4
SH 951957	$2,44 \pm 0,18$	$0,17 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,00$	14,4

**Tab. 4.3** Vergleich der  $K_D$ -Werte von S 920707, HMR 1402, S 981639, SH 951729 und SH 951957 für die Bindung an Sulfonylharnstoffrezeptor-Subtypen. Die  $K_D$ -Werte wurden nach CHENG und PRUSOFF (1973) unter Verwendung der in Bindungsexperimenten ermittelten  $IC_{50}$ -Werte sowie der  $K_D$ -Werte von Glibenclamid (0,55 nM; DÖRSCHNER et al., 1999) oder P1075 (46 nM für SUR2A, 12 nM für SUR2B; SCHWANSTECHE et al., 1998) und den freien [ $^3H$ ]Ligand-Konzentrationen berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus jeweils 4 Einzelexperimenten.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 $K_{ATP}$ -Kanal unabhängige Insulinsekretion durch $\beta$ -zytotrope Nährstoffe

#### 5.1.1 Blockade der $K_{ATP}$ -Kanäle der B-Zellen durch Glipizid

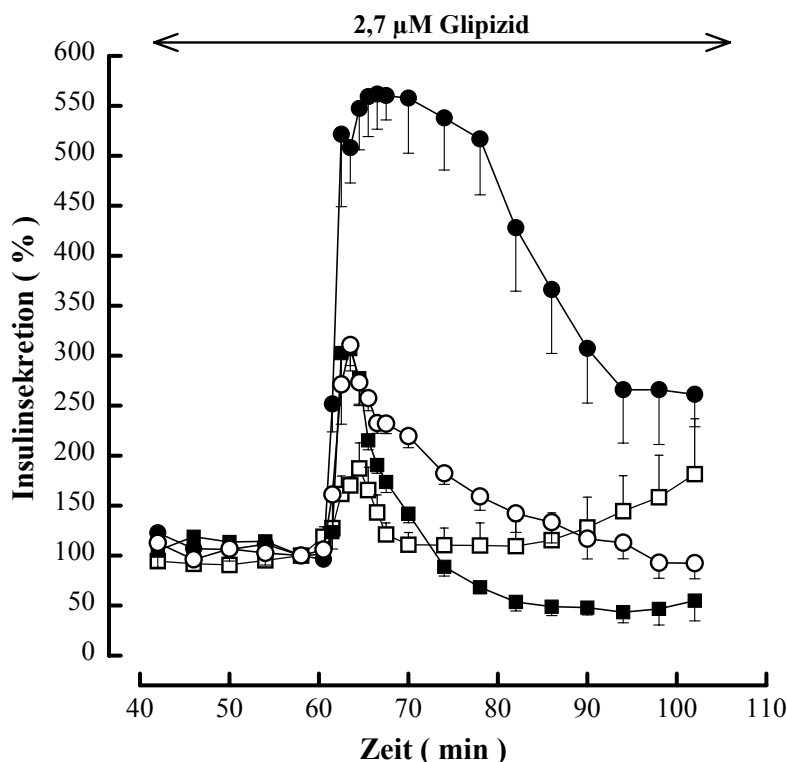
Um einen  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effekt einer Testsubstanz sichtbar zu machen, muss der  $K_{ATP}$ -Kanal-vermittelte Weg der Insulinsekretion „ausgeschaltet“ sein. Dies geschah in den Versuchen durch Perifusion der Pankreasinseln mit dem Sulfonylharnstoff Glipizid. Glipizid (Abb. 1.5 C) bindet hochaffin an die Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals der B-Zelle und führt dadurch zum Schließen des Kanals. Die Wirkung auf den  $K_{ATP}$ -Kanal ist vermutlich der einzige Mechanismus, über den therapeutische Konzentrationen von Sulfonylharnstoffen die Insulinsekretion stimulieren (PANTEN et al., 1996). Die gewählte Konzentration von 2,7  $\mu$ M Glipizid entspricht einer freien Konzentration von etwa 1,6  $\mu$ M (PANTEN et al., 1989) und ist hoch genug, um alle  $K_{ATP}$ -Kanäle der B-Zellen zu blockieren. Zum einen ist aus früheren Untersuchungen bekannt, dass 4 bzw. >100 nM Glipizid in Anwesenheit von 10 mM Glucose eine halbmaximale bzw. maximale Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln auslöst (PANTEN et al., 1989). Außerdem wurden auch Perifusionen durchgeführt, bei denen getestet wurde, ob ein Anstieg der Glipizid-Konzentration von 2,7  $\mu$ M auf 20  $\mu$ M die Insulinsekretion steigerte. Dies war jedoch weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von 10 oder 40 mM Glucose der Fall (Abb. 4.5). Also kann bei der eingesetzten Glipizid-Konzentration von 2,7  $\mu$ M davon ausgegangen werden, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen tatsächlich alle  $K_{ATP}$ -Kanäle der B-Zelle geschlossen waren.

#### 5.1.2 $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion bei Perifusion mit Glipizid

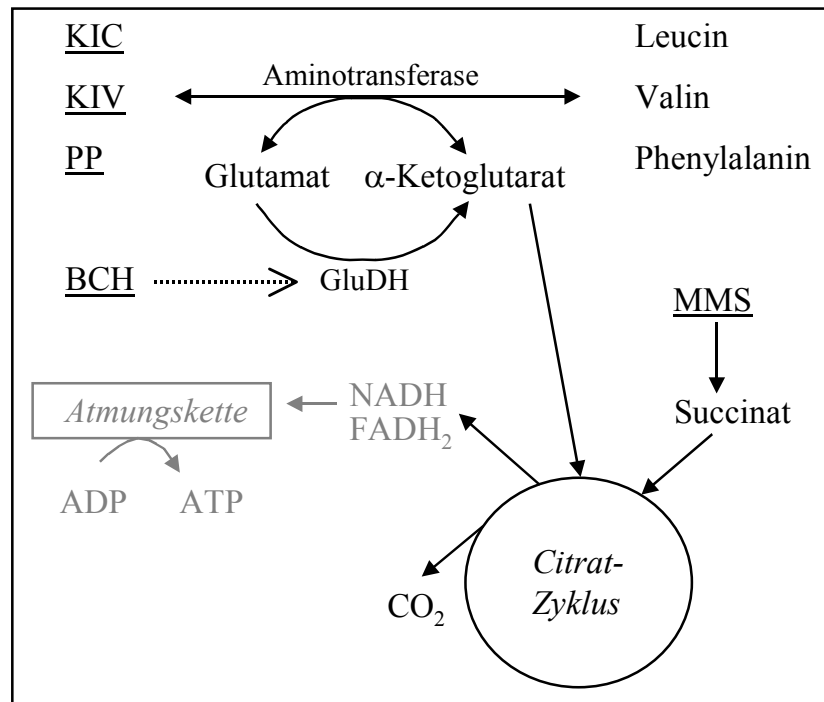
Bei Pankreasinseln, die zuvor mit 2,7  $\mu$ M Glipizid perfundiert worden waren, löste die zusätzliche Gabe von 40 mM Glucose, 20 mM KIC, 20 mM KIV oder 10 mM PP eine  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion aus (Abb. 5.1). KIC bewirkte den stärksten und am längsten anhaltenden Effekt. KIV und PP bewirkten wesentlich schwächere und nur kurz anhaltende Effekte. Glucose induzierte nur einen geringen initialen Anstieg der Sekretionsrate. Im folgenden sank die Rate wieder auf das Ausgangsniveau vor Glucose-Applikation ab, um dann kontinuierlich, aber sehr langsam anzusteigen.

Gemeinsam ist Glucose, KIC, KIV und PP, dass sie von der B-Zelle zur Gewinnung metabolischer Energie genutzt werden können (SENER und MALAISSE, 1984; PANTEN et al., 1984; PANTEN, 1987). Es ist daher denkbar, dass die Unterschiede in der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen  $\beta$ -zytotropen Wirkung der vier Substanzen daraus resultieren, dass sie unterschiedlich gute Energielieferanten sind. Die  $\alpha$ -Ketosäuren KIC, KIV und PP werden in Pank-

reas-Inseln intensiv transaminiert, wobei durch zytosolische und mitochondriale Transaminasen die entsprechenden Aminosäuren L-Leucin, L-Valin und L-Phenylalanin entstehen (PANTEN et al., 1972; MALAISSE et al., 1983; LENZEN et al., 1984, 1985; Abb. 5.2). Als Transaminierungspartner fungieren vor allem Glutamat und Glutamin, die zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt werden (Abb. 5.2).  $\alpha$ -Ketoglutarat als Intermediat des Citratzyklus führt einerseits direkt zu einer Vermehrung des Gehalts an Zyklus-Intermediaten und somit einer Steigerung der Kapazität des Zyklus. Andererseits wird in B-Zellen eine übermäßige Akkumulation von Citratzyklus-Intermediaten dadurch vermieden, dass Einschleusen von  $\alpha$ -Ketoglutarat in den Citratzyklus den Efflux des Zyklus-Intermediats Malat aus den Mitochondrien ins Zytosol steigert (MALAISSE et al., 1980; MACDONALD, 1995; FARFARI et al., 2000). Aus Malat wird dann unter Einschaltung des zytosolischen Malat-Enzyms (ME), welches in B-Zellen eine hohe Aktivität hat (FARFARI et al., 2000), Pyruvat gebildet (Abb. 5.3). Pyruvat kann die B-Zelle direkt oder nach Reduktion zu Lactat verlassen, es kann zu Alanin transaminiert werden oder es kann in die Mitochondrien aufgenommen werden und dort Acetyl-CoA liefern, das als Substrat für die Citratbildung dient. Letztendlich steigert  $\alpha$ -Ketoglutarat also auf zwei Wegen die Umsatzrate des Citratzyklus und dadurch die Energielieferung. Es stellt sich die Frage, ob Unterschiede im Ausmaß der  $\alpha$ -Ketoglutarat-induzierten Energielieferung die Unterschiede in der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen  $\beta$ -zytotropen Wirkung von KIC, KIV und PP erklären können.



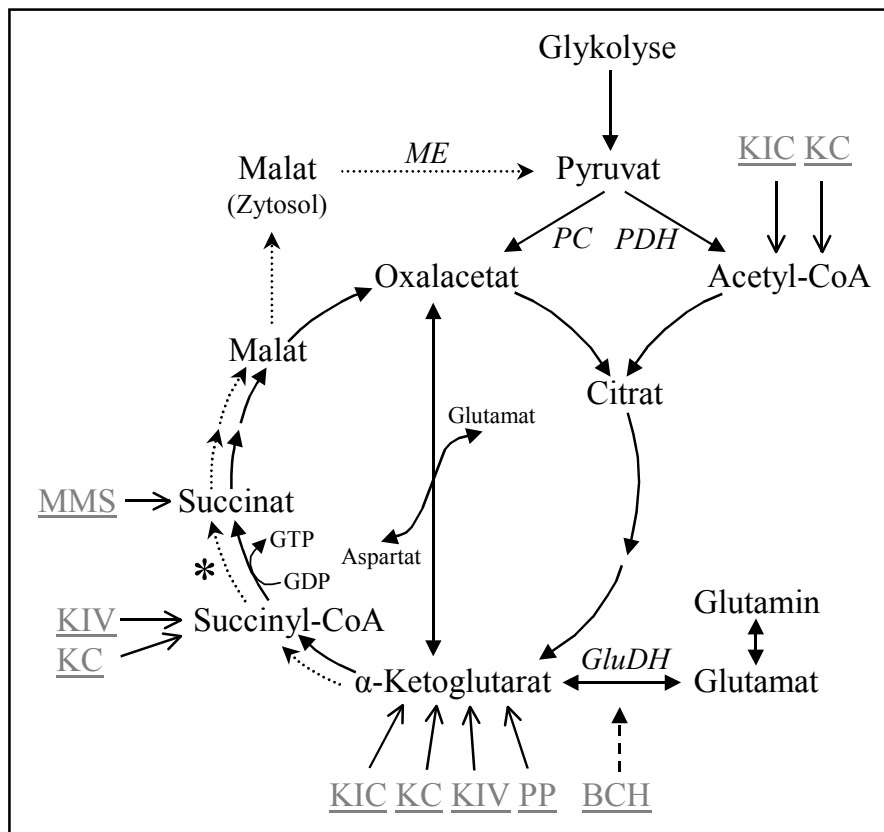
**Abb. 5.1**  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln durch Zugabe von 20 mM KIC (●), 20 mM KIV (○), 10 mM PP (■) oder 40 mM Glucose (□) zum Perifusionsmedium ab Minute 61. Die Medien enthielten 2,7  $\mu$ M Glipizid (Minute 1-104). Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte + oder – SEM aus 4-7 Einzelexperimenten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 58) wurde auf 100 % gesetzt.



**Abb. 5.2** Metabolisierung von  $\alpha$ -Ketoisocapronat (KIC),  $\alpha$ -Ketoisovalerat (KIV),  $\beta$ -Phenylpyruvat (PP) und Monomethylsuccinat (MMS) sowie Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) durch (-)-b-BCH. KIC, KIV und PP werden durch Aminotransferasen zu den entsprechenden Aminosäuren L-Leucin, L-Valin und L-Phenylalanin transaminiert. Als Reaktionspartner fungiert Glutamat oder Glutamin, aus denen  $\alpha$ -Ketoglutarat entsteht.  $\alpha$ -Ketoglutarat wird auch bei der Umsetzung von Glutamat durch die GluDH (durch (-)-b-BCH allosterisch aktiviert) gebildet. MMS wird durch intrazelluläre Esterasen zu Succinat hydrolysiert.  $\alpha$ -Ketoglutarat und Succinat sind Intermediate des Citratzyklus. Durch den aktivierten Citratzyklus werden vermehrt reduzierende Äquivalente (NADH, FADH<sub>2</sub>) als Substrat für die Atmungskette produziert, was zu verstärkter ATP-Produktion führt.

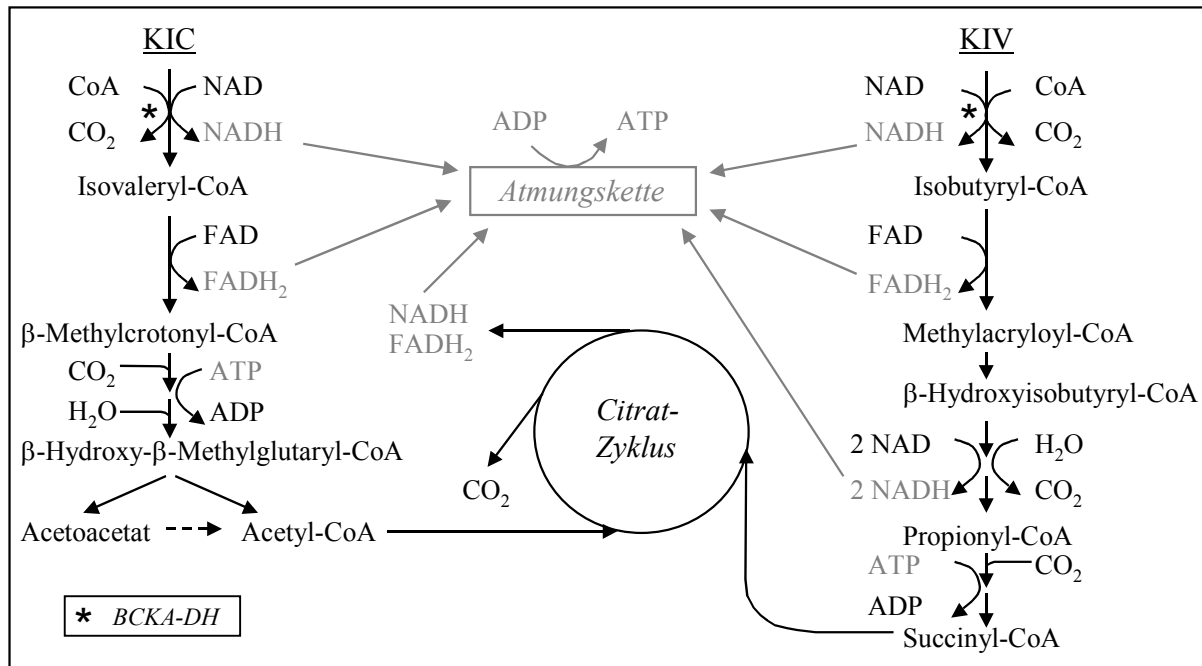
Unterschiede im Ausmaß der  $\alpha$ -Ketoglutarat-induzierten Energielieferung würden sich ergeben, wenn der Transport in die B-Zellen, der Transport durch die innere Mitochondrien-Membran und/oder die Transaminierung für den KIC-, KIV- und PP-induzierten Effekt limitierend wirken würden. Über welches Protonen-gekoppeltes Monocarboxylat-Transportsystem diese  $\alpha$ -Ketosäuren in die B-Zellen gelangen, ist noch unklar (HALESTRAP und PRICE, 1999). Für KIC und PP ist jedoch eine schnelle Aufnahme in Inselzellen beobachtet worden, so dass die intrazellulären Konzentrationen dieser Substanzen etwa 20 % der extrazellulär applizierten Konzentrationen betragen (HUTTON et al., 1979; MALAISSE et al., 1983). Der KIV-Transport in B-Zellen ist bisher nicht untersucht worden. Die Monocarboxylat-Transportsysteme anderer Zellen handhaben KIV aber sehr ähnlich wie KIC (JACKSON und HALESTRAP, 1996; BRÖER et al., 1998, 1999). Somit ist es unwahrscheinlich, dass wesentliche Unterschiede im Transport der drei  $\alpha$ -Ketosäuren durch die B-Zell-Plasmamembran bestehen. Auch für die innere Mitochondrien-Membran der B-Zelle kann angenommen werden, dass sie

KIC, KIV und PP auf sehr ähnliche Weise durchschleust, wie es in den Mitochondrien anderer Zellen der Fall ist (HUTSON und RANNELS, 1985; HUTSON et al., 1990). In B-Zellen werden KIC, KIV und vor allem PP, der schwächste Stimulator der Insulinsekretion (Abb. 5.1), intensiv transaminiert, mit besonders hoher Aktivität in den Mitochondrien (HUTTON et al., 1979; MALAISSE et al., 1983; LENZEN et al., 1984, 1985, 1986). Es kann daher gefolgert werden, dass Unterschiede im Ausmaß der  $\alpha$ -Ketoglutarat-induzierten Energielieferung nicht als wesentliche Ursachen für die Unterschiede in der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen  $\beta$ -zytotropen Wirkung von KIC, KIV und PP in Betracht kommen.



**Abb. 5.3** Eintritt von Produkten des Stoffwechsels von Glucose, KIC, KC, KIV, PP, MMS bzw. vom Produkt der Wirkung von (-)-b-BCH in den Citratzyklus. Die Lieferung von Citratzyklus-Intermediaten erhöht die Kapazität, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit des Zyklus. Das Einschleusen von Intermediaten steigert auch den Efflux von Malat aus den Mitochondrien in das Zytosol (gepunktete Pfeile). Malat wird durch Malat-Enzym (ME) in Pyruvat umgewandelt. Pyruvat kann wieder in die Mitochondrien transportiert werden und dort Acetyl-CoA als Substrat für die Citratbildung liefern. (PC = Pyruvat-Carboxylase; PDH = Pyruvat-Dehydrogenase; GluDH = Glutamat-Dehydrogenase; \* = Substratketten-Phosphorylierung)

Wenn KIC, KIV und PP unter den gegebenen Versuchsbedingungen für die B-Zelle unterschiedlich gute Energielieferanten sein sollten, so könnte dies nur noch aus dem spezifischen Metabolismus (individueller Abbauweg der jeweiligen Substanz) jeder der  $\alpha$ -Ketosäuren resultieren, der ausschließlich intramitochondrial abläuft (Abb 5.4).



**Abb. 5.4** Spezifischer Abbau von  $\alpha$ -Ketoisocapronat (KIC) und  $\alpha$ -Ketoisovalerat (KIV). Beide Ketosäuren werden in den Mitochondrien durch die Verzweigketten-Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKA-DH) oxidativ zu Isovaleryl-CoA bzw. Isobutyryl-CoA decarboxyliert. Bei dieser Reaktion und im Verlauf des weiteren Abbaus werden reduzierende Äquivalente gebildet, die von der Atmungskette zur ATP-Produktion genutzt werden können. KIC wird zu Acetoacetat und Acetyl-CoA metabolisiert. Beim Abbau von KIV entsteht Succinyl-CoA. Succinyl-CoA und besonders Acetyl-CoA als obligates Substrat für die Citratbildung aktivieren den Citratzyklus und somit die NADH/FADH<sub>2</sub>-Produktion bzw. die ATP-Produktion via Atmungskette.

Durch die Verzweigketten-Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKA-DH) findet eine oxidative Decarboxylierung von KIC und KIV zu Isovaleryl-CoA bzw. Isobutyryl-CoA statt. Die Verstoffwechselung von KIC bzw. Isovaleryl-CoA führt über mehrere Zwischenstufen zu den Produkten Acetyl-CoA und Acetoacetat, wobei Acetoacetat teilweise in Acetyl-CoA umgewandelt werden kann (PANTEN und KLEIN, 1982). Acetyl-CoA als obligates Substrat für die Citratbildung kann eine starke Aktivierung des Citratzyklus bewirken. Daraus resultiert eine vermehrte Produktion von NADH und FADH<sub>2</sub>, die von der Atmungskette zur ATP-Produktion genutzt werden können. Beim Abbau von KIV bzw. Isobutyryl-CoA entsteht kein Acetyl-CoA, sondern Succinyl-CoA. Genauso wie es zuvor für die Verwertung von  $\alpha$ -Ketoglutarat beschrieben wurde, kann auch Succinyl-CoA den Efflux des Zyklus-Intermediats Malat aus den Mitochondrien ins Zytosol steigern und auf dem Weg über Pyruvat intramitochondriales Acetyl-CoA liefern (Abb. 5.3). Allerdings ist dieser Weg der Acetyl-CoA-Produktion viel weniger effektiv als der beim Abbau von KIC, weil Malat und Pyruvat im Zytosol auch zur Bildung von anderen Produkten (z.B. Aspartat, Alanin, Lactat) herangezogen werden. Beim Abbau von KIC und KIV ist die Produktion von Acetyl-CoA nicht die al-



leinige Quelle für NADH und FADH<sub>2</sub>, sondern es entstehen diese reduzierenden Äquivalente auch unmittelbar (Abb. 5.4). PP kann in B-Zellen offenbar zu Phenylacetyl-CoA oxidativ decarboxyliert werden und dabei pro abgebautem PP-Molekül 1 NADH liefern (MALAISSE et al., 1983). Anders als in einigen anderen Zellen kann Phenylalanin, das Transaminierungsprodukt von PP, in B-Zellen aber nicht zu Tyrosin hydroxyliert und dann weiter metabolisiert werden (PANTEN und LANGER, 1981). Eine Abschätzung des ATP-Gewinns aus dem spezifischen Abbau von KIC, KIV und PP in B-Zellen (Tab. 5.1) zeigt, dass Unterschiede in der Energielieferung die Unterschiede in der K<sub>ATP</sub>-Kanal-unabhängigen  $\beta$ -zytotropen Wirkung der drei  $\alpha$ -Ketosäuren erklären können.

	KIC	KC	KIV <sup>+</sup>	PP
Unmittelbares NADH und FADH <sub>2</sub>	5	5	8	3 <sup>□</sup>
Unmittelbarer ATP-Verbrauch	-1 <sup>◇</sup>	-1 <sup>◇</sup>	-0,5 <sup>◇</sup>	
Acetyl-CoA	12 <sup>◆</sup>	12 <sup>◆</sup>		
Acetoacetat	5 <sup>○</sup>			
Substratketten-Phosphorylierung (Citratzyklus)		1	0,5	
Pyruvat		5 <sup>■</sup>	2,5 <sup>■</sup>	
<b>Gesamt ATP</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>10,5</b>	<b>3</b>

**Tab. 5.1** ATP-Gewinn aus dem spezifischen Abbau von KIC, KC, KIV und PP in B-Zellen.

<sup>□</sup> Der Abbau von KIC zu Acetyl-CoA und Acetoacetat, von KC zu Acetyl-CoA und Succinyl-CoA sowie von KIV zu Succinyl-CoA verbraucht 1 ATP (PETRIDES, 1997; Abb. 5.4).

<sup>◇</sup> PETRIDES, 1997

<sup>○</sup> 20 % des gebildeten Acetoacetats wird oxidiert (PANTEN und KLEIN, 1982), das ATP-Äquivalent von Acetoacetat beträgt 23 (PETRIDES, 1997).

<sup>■</sup> Aus Daten von MALAISSE et al. (1980) wird geschätzt, dass 1/3 des aus zytosolischem Malat gebildeten Pyruvats in den B-Zell-Mitochondrien oxidiert wird (ATP-Äquivalent von Pyruvat = 15; PETRIDES, 1997).

<sup>◆</sup> Der Abbau von hohen Phenylpyruvat-Konzentrationen zu Phenylacetyl-CoA ist in den Inseln offenbar möglich (MALAISSE et al., 1983). Der physiologische Abbau über Phenylalanin- und Tyrosin-Bildung findet in Inseln nicht statt (PANTEN und LANGER, 1981).

<sup>+</sup> Es wurde angenommen, dass nach der Bildung von  $\beta$ -Hydroxyisobutyryl-CoA (Abb. 5.4) nur 50 % des  $\beta$ -Hydroxyisobutyryls weiter metabolisiert werden, weil  $\beta$ -Hydroxyisobutyryl-Efflux aus den Mitochondrien und den B-Zellen wahrscheinlich ist (für Leber und Skelettmuskel beschrieben, WILLIAMSON et al., 1984; LEE und DAVIS, 1986). Dieser  $\beta$ -Hydroxyisobutyryl-Verlust der B-Zelle ist eher zu niedrig angesetzt.

Diese Korrelation zwischen  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängiger Insulinsekretion und Energielieferung schließt jedoch nicht aus, dass die unveränderten KIC-, KIV- und PP-Moleküle eine direkte Wirkung auf den Transport und/oder die Exozytose der insulinhaltigen Sekretionsgranula ausüben. Es wäre aber ein merkwürdiger Zufall, wenn KIC, KIV und PP eine derartige direkte Wirkung mit einer Rangfolge ausüben würden, die gleichzeitig ihrer Fähigkeit zur Energielieferung durch ihren spezifischen Metabolismus entspricht.

Der spezifische Metabolismus von KIC, KIV und PP kann zwar die Unterschiede in ihrer  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen  $\beta$ -zytotropen Wirkung erklären, aber nicht den Befund, dass die  $\beta$ -zytrotrope Wirkung millimolare Konzentrationen dieser  $\alpha$ -Ketosäuren erfordert (Abb. 5.1). Die intrazellulären Konzentrationen dieser  $\alpha$ -Ketosäuren liegen um etwa 80 % niedriger als die extrazellulär applizierten (HUTTON et al., 1979; MALAISSE et al., 1983). Sie spiegeln vor allem die zytosolischen Konzentrationen wider, weil das extraorganelläre Zytoplasma (= Zytosol) der B-Zelle rund 50 % des Zellvolumens ausmacht (PANTEN und LENZEN, 1988) und ausgeprägte intraorganelläre Anreicherung von KIC, KIV und PP bisher für keine Zelle beschrieben wurde. Aufgrund der allgemeinen Eigenschaften der Monocarboxylat-Transportsysteme in der inneren Mitochondrien-Membran (HUTSON und RANNELS, 1985; HUTSON et al., 1990) dürften auch die intramitochondrialen Konzentrationen von KIC, KIV und PP in derselben Größenordnung liegen wie im Zytosol. Somit werden bei extrazellulärer Applikation  $\beta$ -zytrotroper  $\alpha$ -Ketosäuren in den B-Zell-Mitochondrien Konzentrationen erwartet, die 10-100fach über den  $K_M$ -Werten dieser  $\alpha$ -Ketosäuren für die Verzweigtketten-Ketosäuren-Dehydrogenase, dem ersten Enzym beim Abbau von KIC und KIV (Abb. 5.4), das wahrscheinlich auch PP umsetzen kann, liegen ( $K_M$  für KIC bzw. KIV ist 0,01-0,03 mM bzw. 0,03 mM; RANDLE et al., 1984; PAXTON et al., 1988). Dazu passt die Beobachtung, dass 0,05 mM KIC die ATP-Produktion isolierter B-Zell-Mitochondrien halbmaximal stimuliert (LEMBERT und IDAHL, 1998). Daher kann das Benötigen millimolarer Konzentrationen von KIC, KIV oder PP zum Induzieren  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängiger Insulinsekretion nur daran liegen, dass diese hohen Konzentrationen erforderlich sind, um durch Transaminierungsreaktionen soviel  $\alpha$ -Ketoglutarat in den B-Zell-Mitochondrien bereitzustellen, dass der Citratzyklus ausreichend mit Intermediaten aufgefüllt wird und mit gesteigerter Kapazität vermehrt reduzierende Äquivalente für die ATP-Produktion liefert. Dabei wird kontinuierlich endogenes Glutamin und Glutamat verbraucht, weil Intermediate u.a. für biosynthetische Zwecke aus dem Zyklus abgezweigt werden. So kann nach einiger Zeit die Versorgung mit  $\alpha$ -Ketoglutarat abnehmen und die Sekretionsrate wieder abfallen. Dieser Sekretionsabfall wird um so früher und stärker einsetzen, je mehr Zyklus-Intermediate über die Sequenz Malat-Pyruvat (Abb. 5.3) zur Acet-

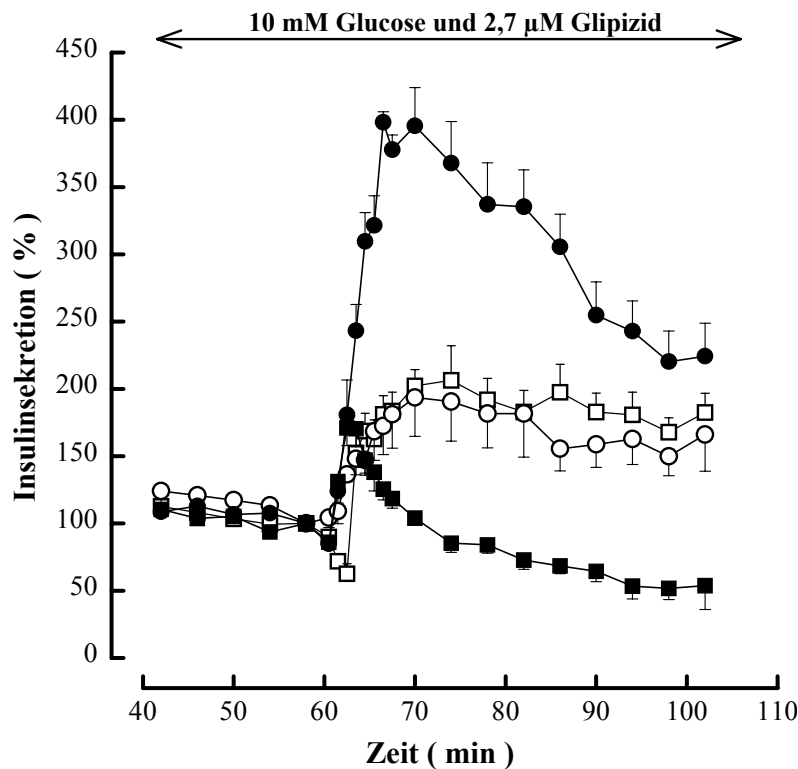
yl-CoA-Produktion und damit letztendlich zur Energiegewinnung verbraucht werden. Die Energiegewinnung aus dem spezifischen Stoffwechsel ist bei KIC viel höher als bei KIV und PP (Tab. 5.1). Daher „schont“ KIC die Zyklus-Intermediate viel stärker als es bei KIV und PP der Fall ist.

Die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige  $\beta$ -zytotrope Wirkung von KIC, KIV und PP resultiert also aus der Transaminierung der drei  $\alpha$ -Ketosäuren und der durch Einschleusung von  $\alpha$ -Ketoglutarat gesteigerten Kapazität des Citratzyklus. In dieser Hinsicht unterscheiden sich die drei  $\alpha$ -Ketosäuren nicht wesentlich. Dies drückt sich auch darin aus, dass die  $\beta$ -zytotropen Konzentrationen für KIC, KIV und PP in einem ähnlichen Bereich liegen. Die Unterschiede im spezifischen Metabolismus der drei  $\alpha$ -Ketosäuren führen aber zu unterschiedlicher Verzögerung des Verbrauchs an Zyklus-Intermediaten und damit zu Unterschieden im Ausmaß und in der Kinetik der Sekretionssteigerung.

Durch 60-minütige substratfreie Perfusion bei gleichzeitig gesteigertem ATP-Verbrauch als Folge der Glipizid-induzierten Sekretionsarbeit befindet sich die B-Zelle im Energiemangel-Zustand. In dieser Situation kann die Metabolisierung von KIC, KIV und PP unmittelbar in Gang gesetzt werden, ohne dass zunächst ATP-verbrauchende Reaktionen stattfinden müssen. Dagegen erfolgt die Metabolisierung von Glucose in den ersten Schritten der Glykolyse unter ATP-Verbrauch und muss dabei mit anderen ATP-verbrauchenden Reaktionen konkurrieren. Gleichzeitig kann eine kräftige Steigerung der Energieproduktion durch den Citratzyklus erst dann in Gang kommen, wenn die Zyklus-Intermediate durch Vermittlung der ATP-verbrauchenden Pyruvat-Carboxylase-Reaktion aufgefüllt worden sind. Diese Besonderheiten des Glucose-Metabolismus könnten erklären, warum die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige  $\beta$ -zytotrope Wirkung von Glucose so sehr viel schwächer und langsamer ausfiel als die entsprechenden Wirkungen von KIC, KIV und PP (Abb. 5.1).

### **5.1.3 $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion bei Perfusion mit Glipizid und 10 mM Glucose**

Um den Energiemangel der B-Zellen zu vermindern, wurden Versuche durchgeführt, bei denen außer Glipizid auch kontinuierlich 10 mM Glucose appliziert wurde. Auch unter diesen Bedingungen steigerte 20 mM KIC die Sekretion erheblich stärker als zusätzliche 30 mM Glucose, 20 mM KIV oder 10 mM PP (Abb. 5.5).



**Abb. 5.5**  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Steigerung der Insulinsekretion isolierter Maus-Pankreasinseln durch Zugabe von 20 mM KIC (●), 20 mM KIV (○), 10 mM PP (■) oder 30 mM Glucose (□) zum Perifusionsmedium ab Minute 61. Die Medien enthielten 10 mM Glucose und 2,7  $\mu$ M Glipizid (Minute 1-104). Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben sind die Mittelwerte + oder - SEM aus 4 Einzelerperimenten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf die Testsubstanz (Minute 58) wurde auf 100 % gesetzt.

40 mM Glucose bewirkte bei vorheriger Perifusion mit 10 mM Glucose und Glipizid ein ganz anderes Sekretionsmuster als bei vorheriger Perifusion mit nur Glipizid. In den ersten 3 Minuten nach Erhöhung der Glucosekonzentration sank die Sekretionsrate auf 63 % des Ausgangsniveaus und erreichte erst danach schnell ein anhaltendes Plateau bei 180-200% (Abb. 5.5). Diese initiale Hemmung der Insulinsekretion fand nur in Gegenwart von Sulfonylharnstoffen statt (vgl. Abb. 4.1) und wurde schon früher beschrieben (PANTEN et al., 1988). In dieser Phase nimmt die zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration vorübergehend ab (HENQUIN, 2000). Der  $Ca^{2+}$ -Spiegel im Zytosol ist wahrscheinlich deshalb kurzfristig erniedrigt, weil das durch die aktivierte Glykolyse vermehrt produzierte ATP im Zytosol den ATP-abhängigen  $Ca^{2+}$ -Transport ins endoplasmatische Retikulum antreibt. Bei den Versuchen ohne vorherige Perifusion mit 10 mM Glucose (Abb. 5.1) konnte man wahrscheinlich diesen transienten Abfall der Sekretionsrate nach Zugabe von 40 mM Glucose deshalb nicht beobachten, weil Glipizid in Abwesenheit von 10 mM Glucose die zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration viel weniger erhöht als in Anwesenheit von 10 mM Glucose und damit ein kurzfristiges Senken der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu gering ausfällt, um sich im Sekretionsprofil bemerkbar zu machen.

Die Verbesserung der Energieversorgung der B-Zellen durch vorherige Perifusion mit 10 mM Glucose verhinderte den Wiederabfall der KIV-induzierten  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion und schwächte den Wiederabfall der KIC-induzierten  $K_{ATP}$ -Kanal-

unabhängigen Insulinsekretion ab (vgl. Abb. 5.5 mit Abb. 5.1 ). Dies könnte einfach daran liegen, dass durch die Verbesserung des Energiestatus der B-Zelle der Vorrat an endogenem Glutamin und Glutamat, welche für die  $\beta$ -zytotrope Wirkung von KIV und KIC unbedingt erforderlich sind (s. S. 85, 90, Abb. 5.2), langsamer verbraucht wird. Der Wiederabfall der KIC-induzierten Sekretion (und auch der KC-induzierten Sekretion, Abb. 4.11) bei Anwesenheit von 10 mM Glucose hat aber sicher noch andere Ursachen, weil er nicht durch Glutamin (zellmembrangängige Vorstufe von Glutamat, das durch intramitochondriale Glutaminase zu Glutamat desaminiert wird) verhindert werden konnte (Abb. 4.8). KIC und KC könnten den Transport des Glykolyse-Produkts Pyruvat durch die innere Mitochondrien-Membran, die Pyruvat-Dehydrogenase und/oder die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase hemmen (GIBSON und BLASS, 1976; CORKEY et al., 1981; JACKSON und SINGER, 1983; JACKSON und HALESTRAP, 1996; BRÖER et al., 1999). Unwahrscheinlich ist, dass die sehr hohe Sekretionsrate den Vorrat an insulinhaltigen Granula innerhalb von 10 bis 20 Minuten so sehr erschöpft, dass dadurch die Insulinfreisetzung allmählich absinkt (KILPATRICK und ROBERTSON, 1998; RUSTENBECK, 2002).

Eine besondere Situation liegt beim sehr schnellen Wiederabfall der PP-induzierten  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion vor (Abb. 5.1, 5.5). Dieser Wiederabfall wurde nicht durch 10 mM Glucose verzögert und ging schließlich sogar in Sekretionsraten über, die unter den entsprechenden Sekretionsraten bei Kontrollversuchen ohne PP lagen (Abb. 4.2). Das Besondere dieser Sekretionsprofile resultiert vielleicht aus der Akkumulation eines inhibitorischen PP-Metaboliten, z.B. Phenylacetyl-CoA oder Phenylelessigsäure (s. S. 89). Phenylacetyl-CoA ist ein Inhibitor der Pyruvat-Carboxylase (BAHL et al., 1997) und könnte daher die Glucose-induzierte Aktivierung des Citratzyklus und somit die Insulinsekretion hemmen (FARFARI et al., 2000). Zusätzlich könnten am Wiederabfall bei der PP-induzierten  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion auch noch dieselben Hemm-Prozesse beteiligt sein wie bei der KIC- und KC-induzierten Sekretion (s. o.). Des weiteren wäre denkbar, dass der sehr geringe ATP-Gewinn aus spezifischem Abbau (Tab. 5.1) mitverantwortlich ist für die typischen PP-induzierten Sekretionsprofile. Dagegen spricht jedoch das Fehlen eines Wiederabfalls der Sekretion bei Stimulation  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängiger Insulinsekretion (in Anwesenheit von 10 mM Glucose) durch 10 mM MMS (Abb. 4.14). Dieser zellmembrangängige Ester wird intrazellulär durch Esterasen hydrolysiert, speist dadurch Succinat in den Citratzyklus und stimuliert auf diese Weise die Insulinsekretion (MACDONALD und FAHIEN, 1988; MACDONALD, 1993; Abb. 5.2, 5.3). Für Succinat gibt es also sogar, anders als bei PP, überhaupt keinen ATP-Gewinn durch einen spezifischen Abbau-Weg. Es muss allerdings einschränkend

erwähnt werden, dass die  $\beta$ -zytrotrope Wirkung von MMS schwächer war als diejenige anderer Nährstoffe. Dies liegt möglicherweise an limitierender Esterase-Aktivität in den B-Zellen.

20 mM KC bewirkte eine  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion, deren Stärke und Kinetik mit der ihres Isomers KIC vergleichbar war (Abb. 4.11). KC wird analog KIC verstoffwechselt. KC wird im Zytosol und in den Mitochondrien von B-Zellen ähnlich gut wie KIC mit Glutamin und Glutamat zu L-Norleucin und  $\alpha$ -Ketoglutarat transaminiert (LENZEN et al., 1982). KC wird auch in ähnlichem Ausmaß wie KIC in den Mitochondrien von Pankreasinseln oxidativ decarboxyliert (LENZEN et al., 1982). Dabei entsteht Valeryl-CoA, das durch  $\beta$ -Oxidation Acetyl-CoA und Propionyl-CoA bzw. Succinyl-CoA liefert. Der ATP-Gewinn aus dem spezifischen Abbau von KC in B-Zellen (Tab. 5.1) und die Bereitstellung von  $\alpha$ -Ketoglutarat in den Mitochondrien machen KC zu einem mit KIC vergleichbaren Energielieferanten für B-Zellen. Dies erklärt die ähnliche Potenz beider  $\alpha$ -Ketosäuren bei der Stimulation der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion.

Die ähnlichen  $\beta$ -zytotropen Potenzen von KC und KIC sprechen dagegen, dass am Wirkmechanismus der beiden Substanzen eine Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) durch die Transaminierungsprodukte L-Norleucin bzw. L-Leucin wesentlich beteiligt ist. L-Norleucin ist nämlich im Gegensatz zu L-Leucin, welches die GluDH sehr stark allosterisch aktiviert, nur ein schwacher allosterischer Aktivator der GluDH (PANTEN und LANGER, 1981). In B-Zellen ist normalerweise die GluDH-Reaktion (Abb. 5.2) nur zu einem kleineren Teil für die Versorgung des Citratzyklus mit Intermediaten verantwortlich, weil die Aktivität des intramitochondrialen Enzyms GluDH limitierend ist. Durch allosterische Aktivierung der GluDH kann die oxidative Desaminierung von Glutamat aber soviel  $\alpha$ -Ketoglutarat in den Citratzyklus einspeisen, dass es zur Stimulation der Insulinsekretion durch L-Leucin und einige damit chemisch verwandte Substanzen kommt. Zu solchen Substanzen gehört auch das nicht metabolisierbare L-Leucin-Analogon (-)-b-BCH, das die GluDH genauso stark aktiviert wie L-Leucin (GYLFE, 1976; SENER und MALAISSE, 1980; PANTEN und LANGER, 1981; Abb. 5.2). (-)-b-BCH bewirkte auch eine  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion (Abb. 4.14; LUDWIG, 1991; BERTRAND et al., 2002). In Anwesenheit von 10 mM Glucose + 10 mM Glutamin bzw. 10 mM Glucose war der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Effekt von 20 mM BCH (entsprechend 9 mM (-)-b-BCH, s. 3.1.2.3) nicht stärker als der von 20 mM KIV (Abb. 4.14, 5.5; LUDWIG, 1991). L-Valin, das Transaminierungsprodukt von KIV (Abb. 5.2), aktiviert die GluDH nicht und stimuliert die Insulinsekretion nicht (PANTEN, 1975; PANTEN und LANGER, 1981). Wenn nun in Anwesenheit von 10 mM Glucose KIV (20 mM) und (-)-b-BCH (9 mM) gleichzeitig appliziert wurden, so wurde die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulin-

sekretion zunächst nicht wesentlich mehr stimuliert als es bei alleiniger Applikation einer der beiden Substanzen der Fall war, wobei die Sekretionsrate ein erstes Plateau erreichte (Abb. 4.14). Überraschenderweise begann die Sekretionsrate aber etwa 20 Minuten nach Beginn der gleichzeitigen Applikation von KIV und (-)-b-BCH wieder anzusteigen und erreichte nach weiteren 20 Minuten ein neues Plateau der Sekretion (Abb. 4.14), das etwa der maximalen Sekretionsrate entsprach, die durch 20 mM KIC oder 20 mM KC induziert wurde (Abb. 5.5, 4.11). Dieses Sekretionsprofil spiegelt möglicherweise eine zweistufige Aktivierung des Citratzyklus wider. Das erste Sekretionsplateau könnte dem Auffüllen des Citratzyklus mit Intermediaten entsprechen. Die Versorgung des Citratzyklus mit Acetyl-CoA wäre aber noch durch unzureichendes Angebot an Pyruvat für die Pyruvat-Dehydrogenase limitiert, weil der Efflux von Malat aus den Mitochondrien noch nicht groß genug ist, um über die Malat-Enzym-Reaktion so viel Pyruvat zu liefern, dass die Pyruvat-Dehydrogenase trotz Pyruvat-verbrauchender Konkurrenzreaktionen optimal mit dem Substrat Pyruvat versorgt ist (Abb. 5.3). Durch die gleichzeitige Aktivierung von zwei getrennten Wegen der Einspeisung von  $\alpha$ -Ketoglutarat in den Citratzyklus (Transaminierung von KIV und GluDH-Aktivierung durch (-)-b-BCH) könnte aber unter Erhalt der Auffüllung des Citratzyklus mit Intermediaten der Efflux von Malat aus den Mitochondrien noch weiter gesteigert werden, bis schließlich die Pyruvat-Dehydrogenase optimal mit Substrat versorgt ist. Dann wäre das zweite Sekretionsplateau erreicht.

Erstaunlich ist, dass KIC und KC eine stärkere  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion hervorriefen als Glucose. Beim Glucose-Metabolismus entsteht aus Pyruvat neben Acetyl-CoA auch Oxalacetat durch Reaktion der Pyruvat-Carboxylase (Abb. 5.3). Auch bei der Verstoffwechselung von KIC und KC kann aus dem gebildeten  $\alpha$ -Ketoglutarat im Citratzyklus Oxalacetat entstehen (z.B. auch direkt durch Reaktion des  $\alpha$ -Ketoglutarats mit Aspartat zu Oxalacetat und Glutamat; RUSTIN et al., 1997; Abb. 5.3). Somit können sowohl beim Abbau der Glucose als auch beim Abbau von KIC bzw. KC die beiden notwendigen Substrate für die Citratbildung, d.h. für die Aktivierung des Citratzyklus bereitgestellt werden. Unklar ist, in welchem Ausmaß dies jeweils geschieht. Im Gegensatz zu Glucose werden KIC und KC direkt in den Mitochondrien verstoffwechselt, während die Glucose-induzierte Acetyl-CoA- und Oxalacetat-Bildung von zahlreichen vorgeschalteten Reaktionen abhängig sind, die zu Engpässen werden können: Glykolyse, Pyruvat-Transport in die Mitochondrien, Pyruvat-Abbau durch die Pyruvat-Dehydrogenase, Pyruvat-Carboxylierung durch die Pyruvat-Carboxylase. Dazu kommt noch die Abzweigung von Glucose-Produkten für andere Reaktionen, wie z.B. Lactat- und Alanin-Bildung und biosynthetische Zwecke.

#### **5.1.4 Kataplerose, die nicht der Energiegewinnung dient, und $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängiger Effekt**

Die Stimulation der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion durch Nährstoffe (Glucose, KIC, KC, KIV, PP, MMS) und das Leucin-Analogon (-)-b-BCH kann als Folge vermehrter Bereitstellung von NADH und  $FADH_2$  für die Atmungskette und somit für die ATP-Produktion erklärt werden. Dabei ist die quantitativ wichtigste Quelle für die reduzierenden Äquivalente der Citratzyklus, den die Nährstoffe und (-)-b-BCH durch Lieferung von Zyklus-Intermediaten und Acetyl-CoA aktivieren. Das Auffüllen des Zyklus mit Intermediaten (Anaplerose) ist notwendig, um die Kapazität des Zyklus trotz des Abfließens von Intermediaten aus dem Zyklus (Kataplerose) zu erhalten oder sogar zu steigern (OWEN et al., 2002). Die Kataplerose dient jedoch nicht ausschließlich der Gewinnung metabolischer Energie, wie z.B. durch Steigerung des Pyruvat-Angebots an die Mitochondrien (Abb. 5.3), sondern auch biosynthetischen Zwecken, wie z.B. der Synthese von Aminosäuren und Lipiden. Daher stellt sich die Frage, ob nicht die Stimulation der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion durch Nährstoffe und (-)-b-BCH aus Biosynthese-Förderung resultiert (Abb. 5.6).

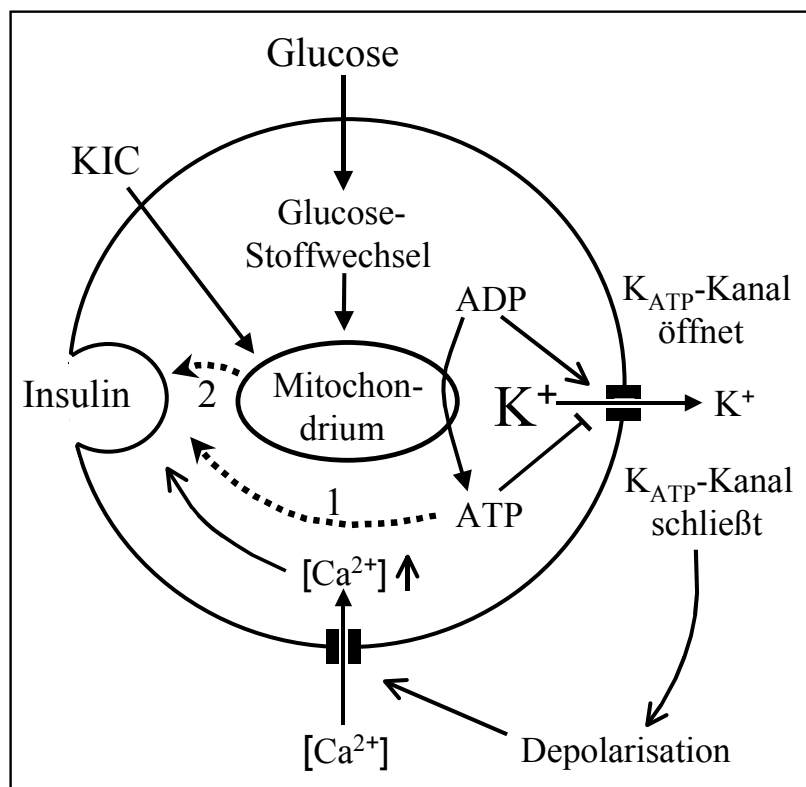
Neogenese von Glycerolphosphat (für die Triglyceridsynthese) oder Glucose gibt es in B-Zellen nicht, weil B-Zellen über keine Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase verfügen (MACDONALD, 1995). Die von MAECHLER und WOLLHEIM (1999) vertretene Hypothese, dass die B-Zell-Mitochondrien anders als allgemein angenommen Glutamat produzieren und nicht verbrauchen und dass Glutamat als Trigger der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion fungiert, ist mit den Ergebnissen der hier geschilderten Versuche mit  $\beta$ -zytotropen  $\alpha$ -Ketomonocarbonsäuren nicht vereinbar. Dies deckt sich mit den Befunden von MACDONALD und FAHIEN (2000), YAMADA et al. (2001) und BERTRAND et al. (2002), die ebenfalls gegen Glutamat als Trigger der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion sprechen.

Bei der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion kann auch Citrat die B-Zell-Mitochondrien verlassen und im Zytosol durch die Citrat-Lyase in Oxalacetat und Acetyl-CoA gespalten werden (FARFARI et al., 2000). Acetyl-CoA steigert die Produktion von Malonyl-CoA, das zur Fettsäuresynthese verwendet werden kann. Gleichzeitig ist Malonyl-CoA ein Hemmstoff der Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT1), die in der äußeren Mitochondrien-Membran lokalisiert und für die Übertragung von Carnitin auf ein zytosolisches Acyl-CoA verantwortlich ist. Dabei entsteht die Fettsäure-Transportform, welche die Passage der Fettsäuren durch die innere Mitochondrien-Membran ermöglicht. Die Inhibition von CPT1 durch Malonyl-CoA hat also aufgrund der Hemmung des Fettsäuren-Transports in die Mitochondrien-Matrix eine Einschränkung der  $\beta$ -Oxidation zur Folge. Eine verminderte  $\beta$ -



Oxidation führt zu erhöhten Konzentrationen von Acyl-CoA im Zytosol. Da langkettige Acyl-CoA-Moleküle verschiedene Gene, Enzyme und Ionenkanäle regulieren und die Exozytose von Insulingranula steigern, wurde postuliert, dass Citrat, Malonyl-CoA und zytosolische Acyl-CoA-Moleküle als Messenger-Moleküle bei der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion fungieren (PRENTKI et al., 1992; CORKEY et al., 2000; FARFARI et al., 2000). Es gibt aber Befunde, die nicht zu dieser Vorstellung passen. Zum einen hemmt eine Verminderung der Malonyl-CoA-Bildung die Glucose-induzierte Insulinsekretion perifundierter isolierter Ratteninseln nicht (SENER und MALAISSE, 1991). Zum anderen beeinträchtigt Triacsin C, ein Inhibitor der Langketten-Acyl-CoA-Synthetase, die Glucose-induzierte Insulinsekretion Insulin-sezierender Zellen nicht, obwohl es die Palmitat-Oxidation der Zellen hemmt (ANTINOZZI et al., 1998). Schließlich zeigen Patch-Clamp-Experimente, dass langkettiges Acyl-CoA die  $K_{ATP}$ -Kanäle von B-Zellen öffnet, was zur Hemmung der Insulinsekretion führt (LARSSON et al., 1996).

Somit ist es unwahrscheinlich, dass Kataplerose, die nicht der Energiegewinnung dient, an der Stimulation der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion durch Glucose, KIC, KC, KIV, PP, MMS und (-)-b-BCH beteiligt ist.



**Abb. 5.6**  $K_{ATP}$ -Kanal-vermittelte und -unabhängige Insulinsekretion. ATP als Produkt des Energiestoffwechsels der B-Zelle reduziert die Offenwahrscheinlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle und induziert so die Insulinsekretion. Möglicherweise fungiert ATP darüber hinaus auch als Trigger der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Sekretion, z.B. durch eine Wirkung auf den exozytotischen Prozess (1). Wenig wahrscheinlich ist Stimulation der Exozytose durch Förderung biosynthetischer Prozesse über den Efflux von Citratzyklus-Intermediaten aus den Mitochondrien (2).

### **5.1.5 Angriffspunkte für ATP, die den $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effekt vermitteln könnten**

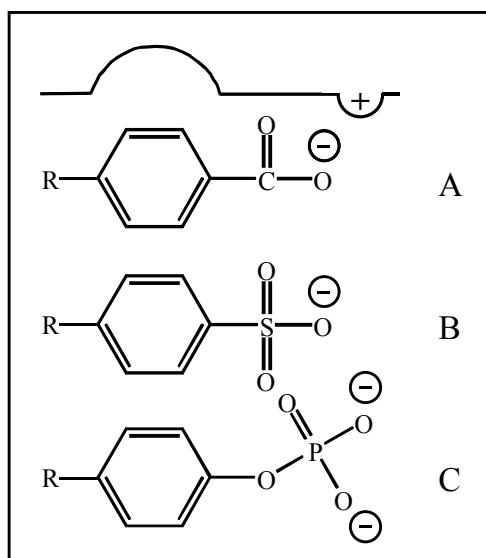
Eine Steigerung der ATP-Produktion ist die beste Erklärung für die Stimulation der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion in meinen Versuchen (Abb. 5.6), in Übereinstimmung mit früheren Hypothesen (PANTEN et al., 1988; RUSTENBECK et al., 1997; HENQUIN, 2000). Als Angriffspunkte für ATP konnten die Phospholipase  $A_2$  (bildet Arachidonsäure), die Phosphatidylinositol-3-Kinase, die Phospholipase C/Proteinkinase C-Signalkaskade, die NO/cGMP-Signalkaskade und die cAMP-Bildung mit anschließender Aktivierung der Proteinkinase A ausgeschlossen werden (HENQUIN, 2000). Bisher nicht ausgeschlossene potentielle Angriffspunkte für ATP sind u.a. die  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (EASOM, 1999; BHATT et al., 2000), der Transport-Mechanismus für die insulinhaltigen Sekretionsgranula an die B-Zellmembran und das Andocken („Docking“) und Priming (ELIASSON et al., 1997) der Granula an der Plasmamembran.

## **5.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Interaktion von Sulfonylharnstoffen und Analoga mit SUR-Subtypen**

### **5.2.1 Phosphatgruppe als anionische Funktion eines Sulfonylharnstoff-Analogons**

MEYER et al. (1999) haben gezeigt, dass eine anionische Funktion wie die Sulfonylharnstoff-Gruppe im Glibenclamid oder die Carboxylgruppe im Meglitinid die Wechselwirkung von Sulfonylharnstoffen und Analoga mit SUR-Isoformen begünstigt. Es sollte geprüft werden, ob auch eine Phosphatgruppe die anionische Funktion übernehmen kann. {4-[2-(5-Chlor-2-methoxybenzamido)ethyl]phenyl}phosphat (Abb. 2.3 A) unterscheidet sich vom Meglitinid (Abb. 5.10) durch den Austausch dessen Carboxylgruppe durch eine mit Phosphorsäure veresterte Hydroxylgruppe. Die gefundene Affinität ( $1/K_D$ ) dieses Phosphorsäure-Esters für die Bindung an SUR1 war etwa 7fach größer als die entsprechenden Affinitäten von Meglitinid und seinem Sulfonsäure-Analogon (Tabelle 4.1; MEYER et al., 1999; DÖRSCHNER et al., 1999). Auch die Potenz ( $1/EC_{50}$ ) dieses Phosphorsäure-Esters für die Hemmung von  $K_{ATP}$ -Kanälen des SUR1/ $K_{IR6.2}$ -Typs war größer (5-8fach) als die entsprechenden Potenzen von Meglitinid und seinem Sulfonsäure-Analogon (Abb. 4.17; DÖRSCHNER et al., 1999; SCHWANSTECHER et al., 1994). Diese Befunde zeigen, dass eine Phosphatgruppe eine günstigere Interaktion mit SUR1 ermöglicht als eine Carboxyl- oder Sulfonylgruppe. Ursache könnte die stärkere Ladung des Phosphat-Restes sein und/oder die flexiblere Verknüpfung des Phosphat-Restes mit dem aromatischen Ring B (Abb. 5.7). Daher ist es sinnvoll, nach phosphorylierten

Peptiden bzw. Tyrosinphosphat-Peptiden als endogenen Liganden für Sulfonylharnstoff-Rezeptoren zu suchen.



**Abb. 5.7** Modell der Interaktion unterschiedlicher anionischer Gruppen von Sulfonylharnstoff-Analoga mit Carboxylgruppe (A), Sulfonylgruppe (B) oder Phosphatgruppe (C) mit SUR1.

Meglitinid zeigt keine SUR1-Selektivität, da seine anionische Gruppe über keinen lipophilen Substituenten (wie z.B. den Cyclohexyrling bei Glibenclamid) verfügt (MEYER et al., 1999). Demzufolge wäre auch beim Phosphorsäure-Ester keine SUR1-Selektivität zu erwarten gewesen. Der  $K_D$ -Wert für die Bindung an SUR1 erwies sich jedoch als signifikant niedriger als die  $K_D$ -Werte für die SUR2-Isoformen (Tab. 4.1). Dieser Unterschied ist aber möglicherweise ein experimentelles Artefakt. Es kann nämlich nicht ausgeschlossen werden, dass bei den Bindungsexperimenten mit Membranen von SUR2-Isoformen exprimierenden Zellen der Phosphorsäure-Ester durch membranständige Phosphatasen stärker hydrolysiert wurde als es bei den Bindungsexperimenten mit SUR1-haltigen Membranen der Fall war. Phosphatasen sind in derartigen Membranpräparationen immer zu erwarten, und die Membrankonzentrationen waren in den Bindungsexperimenten mit SUR2-Isoformen etwa 10fach höher als in den Bindungsexperimenten mit SUR1. Diese Interpretation der Affinitätsunterschiede wird gestützt durch die Beobachtung, dass bei der Durchführung der Bindungsexperimente in Gegenwart von 6 mM NaF (Phosphatase-Inhibitor) der  $IC_{50}$ -Wert des Phosphorsäure-Esters für die [ $^3H$ ]P1075-Verdrängung aus seiner Bindung an SUR2A von 13,7  $\mu M$  auf 7,01  $\mu M$  gesenkt wurde.

Durch Hydrolyse des Phosphorsäure-Esters entsteht 5-Chlor-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-2-methoxybenzamid (Abb. 2.3 B). Diese phenolische Verbindung liegt auf-

grund eines  $pK_S$ -Wertes von etwa 10 bei den gegebenen Versuchsbedingungen (pH 7,40) praktisch vollständig undissoziiert vor, besitzt also keine anionische Gruppe. Erwartungsgemäß waren die gefundenen Affinitäten dieser Verbindung zu den drei SUR-Subtypen um den Faktor 22-55 niedriger als die des Phosphorsäure-Esters (Tab. 4.1).

### 5.2.2 SUR-Affinität von Repaglinid und Analoga sowie deren Stereoisomeren

Das Benzoesäure-Derivat Repaglinid (NovoNorm<sup>®</sup>, Abb. 2.4, 5.8) band an SUR1, SUR2A und SUR2B mit sehr ähnlichen Affinitäten ( $K_D \approx 50$  nM, Tab. 4.2). Repaglinid war also für keine dieser Rezeptor-Bindungsstellen selektiv. Diese Ergebnisse passen zu Patch-Clamp-Experimenten, die für die Repaglinid-induzierte Hemmung von  $K_{ATP}$ -Kanälen der Typen SUR1/ $K_{IR6.2}$ , SUR2A/ $K_{IR6.2}$  und SUR2B/ $K_{IR6.2}$  sehr ähnliche Potenzen mit  $EC_{50}$ -Werten im Bereich von 7-10 nM ergaben (DABROWSKI et al., 2001). Die Affinität von Repaglinid für die Bindung an SUR2A und SUR2B war 5-6fach höher als die entsprechenden Affinitäten von Glibenclamid ( $K_D$ -Wert von Glibenclamid für die Bindung an SUR2A bzw. SUR2B = 290 nM bzw. 250 nM; DÖRSCHNER et al., 1999). Es ist unwahrscheinlich, dass dies am Fehlen eines möglicherweise sterisch hemmenden Substituenten in Nachbarschaft zur anionischen Gruppe liegt. Im Falle des Glibenclamid-Moleküls steigert jedenfalls das Fehlen des der anionischen Gruppe benachbarten Cyclohexylrings die Affinität für SUR2 nicht (MEYER et al., 1999). Somit ist anzunehmen, dass Molekülbereiche des Repaglinids, über die Glibenclamid nicht verfügt (Piperidin-Rest am aromatischen Ring A, Isobutyl-Rest an der die beiden aromatischen Ringe A und B verbindenden Kette und Ethoxy-Rest am Ring B, Abb. 5.8), für die stärkere Bindung an SUR2A und SUR2B verantwortlich sind.

Das R-Enantiomer des Repaglinids, AG-EE 624 ZW, zeigte ebenfalls keine Selektivität für eine der SUR-Isoformen, hingegen eine 100fach geringere Affinität zu SUR1 und SUR2A ( $K_D \approx 5$   $\mu$ M) als sein Spiegelbild-Isomer (Tab. 4.2). Somit befinden sich beim Repaglinid (S-Enantiomer) die Substituenten am asymmetrischen C-Atom in einer für die Bindung an die SUR-Subtypen besonders günstigen räumlichen Anordnung.

AG-EE 319 ZW (Abb. 2.4) unterscheidet sich vom Repaglinid durch das Vorliegen einer Propyl- anstelle der Isobutylgruppe an der die aromatischen Ringe A und B verbindenden Kette und durch das Fehlen der Ethoxygruppe am Ring B. Auch diese Verbindung band mit gleicher Affinität an SUR1 und SUR2A (Tab. 4.2). Obwohl der  $K_D$ -Wert für die Bindung an SUR2B 3fach höher lag, kann dieser geringfügige Unterschied nicht als Indiz dafür gewertet werden, dass AG-EE 319 ZW eine gewisse Selektivität für SUR1 und SUR2A besitzt. Die Ursache für die etwa 12fach niedrigere Rezeptoraffinität von AG-EE 319 ZW ( $K_D \approx 600$  nM)

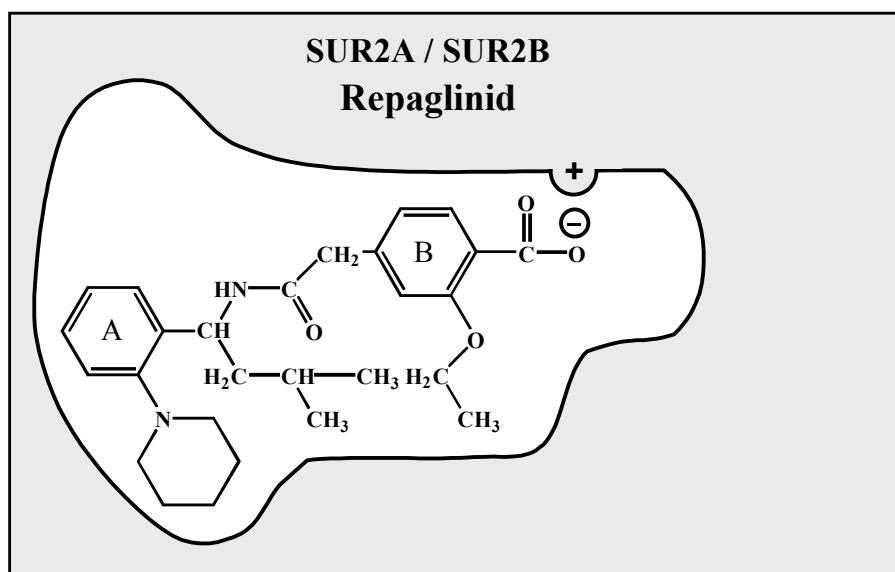
im Vergleich zu Repaglinid könnte in der geringeren Lipophilie dieser Verbindung begründet sein. Repaglinid kann aufgrund seiner Isobutylgruppe und v.a. aufgrund der zusätzlichen Ethoxygruppe mehr hydrophobe Wechselwirkungen mit der Bindungsstelle eingehen als AG-EE 319 ZW.

AG-EE 436 ZW, das Spiegelbild-Isomer (R-Konfiguration) des AG-EE 319 ZW (S-Konfiguration), führte wiederum zu einer Bindung mit gleicher Affinität an die Rezeptor-Subtypen (Tab. 4.2). Die ermittelten  $K_D$ -Werte von etwa 10  $\mu\text{M}$  lagen allerdings um den Faktor 10 höher als bei AG-EE 319 ZW. Wie bei dem Enantiomeren-Paar Repaglinid (S) und AG-EE 624 ZW (R) zeigte also auch hier das S-Enantiomer die höhere Rezeptoraffinität. Offenbar ermöglicht die in der S-Konfiguration vorliegende räumliche Anordnung generell eine bessere Anpassung an die Rezeptorbindungsstelle.

AG-DD 1461 ZW (Abb. 2.4) verfügt im Gegensatz zu AG-EE 319 ZW/AG-EE 436 ZW über keine Alkylgruppe an der die beiden aromatischen Ringe A und B verbindenden Kette. Auch diese Verbindung unterschied bei der Bindung nicht zwischen SUR1 und SUR2A (Tab. 4.2). Der  $K_D$ -Wert für die Bindung an SUR2B ( $K_D = 1,3 \mu\text{M}$ ) war etwas kleiner als der  $K_D$ -Wert für die SUR2A-Bindung ( $K_D = 4,5 \mu\text{M}$ ). Dieser Unterschied war aber zu gering, um für AG-DD 1461 ZW eine SUR2B-Selektivität sicher zu belegen. Die Affinität zu SUR1 und SUR2A war vergleichbar mit der von AG-EE 624 ZW und AG-EE 436 ZW, und sie erwies sich als deutlich geringer als die von Repaglinid und AG-EE 319 ZW (Tab. 4.2). Das bedeutet, dass das Vorliegen einer Alkylgruppe, sofern sie sich in der S-Konfiguration befindet, sich vorteilhaft auf die Bindung an SUR1 und SUR2 auswirkt.

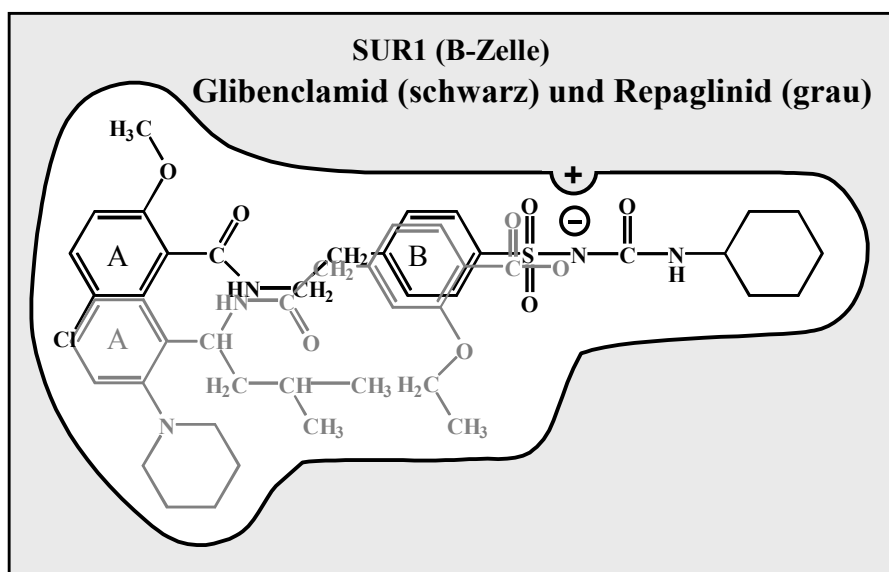
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle getesteten Substanzen jeweils mit sehr ähnlicher Affinität an SUR1, SUR2A und SUR2B banden, d.h. eine Selektivität für einen der drei Rezeptor-Subtypen konnte nicht gezeigt werden. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Repaglinid und Analoga Bindungsstellen am SUR besetzen, die allen drei Subtypen gemeinsam sind. Die unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen Testsubstanzen für die SUR-Bindung erklären sich aus deren Konfiguration (S-Konfiguration ist vorteilhaft) und deren Substitutionsmuster (Alkylgruppe an der die aromatischen Ringe A und B verbindenden Kette und Ethoxygruppe am Ring B sind vorteilhaft). Ein Modell für die Anpassung von Repaglinid an seine Bindungsstelle ist in Abb. 5.8 dargestellt. Die SUR2-Isoformen, aber auch SUR1 verfügen über Regionen, welche die Bindung der anionischen Gruppe am aromatischen Ring B und die Bindung des aromatischen Ringes A vermitteln (MEYER et al., 1999). Möglicherweise existieren außerdem Bereiche mit guter Passform für den Piperidinring sowie für die

Isobutyl- und Ethoxygruppe. Dies würde die gleichermaßen hohe Affinität von Repaglinid für die Bindung an die drei Rezeptor-Subtypen erklären.



**Abb. 5.8** Modell der Bindungsstellen-Bereiche für Repaglinid am SUR2A und SUR2B. Auf SUR2A und SUR2B, aber auch auf SUR1 existieren Bereiche mit guter Passform für die anionische Gruppe und den aromatischen Ring A sowie für weitere Bestandteile des Repaglinid-Moleküls (Piperidinring am Ring A, Isobutylgruppe an der die Ringe A und B verbindenden Kette, Ethoxygruppe am Ring B).

Nicht abschließend geklärt ist bislang die Frage, ob Repaglinid mit derselben Bindungsstelle wie Glibenclamid interagiert. Fest steht, dass Repaglinid in Bindungsexperimenten [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid aus seiner Bindung am SUR1 verdrängt. Das weist darauf hin, dass Repaglinid zumindest Teile der Glibenclamid-Bindungsstelle besetzen kann. Bei Bindungsexperimenten mit [ $^3\text{H}$ ]Repaglinid als zu verdrängendem Liganden bewirkt Repaglinid schon bei niedrigeren Konzentrationen eine halbmaximale Verdrängung als bei Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid (FUHLENDORFF et al., 1998). Eine Interpretationsmöglichkeit für diesen Befund wäre, dass Repaglinid und Glibenclamid durch die Besetzung völlig getrennter Bindungsstellen auf einem Sulfonylharnstoff-Rezeptor wirken. Andererseits kann man diesen Befund auch dann erklären, wenn es auf einem Sulfonylharnstoff-Rezeptor nur eine einheitliche Bindungsstelle für Repaglinid und Glibenclamid gibt. In diesem Fall wäre zu postulieren, dass die von Repaglinid bzw. Glibenclamid besetzten Bindungsstellen-Areale teilweise verschieden sind.



**Abb. 5.9** Modell einer einheitlichen Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe und Analoga am SUR1. Repaglinid bindet an Teile des Glibenclamid-bindenden Areals und darüber hinaus noch an andere Bereiche der Bindungsstelle.

Abb. 5.9 zeigt ein Modell einer einheitlichen Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe und Analoga am SUR1. Die SUR1-Bindungstasche unterscheidet sich (u.a.) von SUR2 durch ein größeres Raumangebot für voluminöse lipophile Substituenten wie den Cyclohexylring des Glibenclamids. An der hochaffinen Bindung von Glibenclamid an SUR1 sind verschiedene Molekülbereiche beteiligt. Dazu zählen die Cyclohexylgruppe, des weiteren der aromatische Ring B, an den die anionische Sulfonylharnstoff-Gruppe geknüpft ist sowie ein lipophiler Substituent (Ring A), der über eine kurze aliphatische Kette mit einer Amidgruppe mit dem aromatischen Ring B verbunden ist (s. auch Abb. 2.2). Repaglinid verfügt über keinen lipophilen Substituenten an der anionischen Gruppe. Es kann nur deshalb mit insgesamt höherer Affinität an die Bindungsstellen-Areale binden als Glibenclamid (FUHLENDORFF et al., 1998), weil das Repaglinid-Molekül zusätzliche ausgeprägt lipophile Strukturen (Piperidinring, Isobutyl- und Ethoxygruppe) aufweist, die nicht im Glibenclamid vorkommen und die über besondere Bindungsstellen-Areale die Bindung von Repaglinid so sehr hochaffin machen (Abb. 5.9).

Im Gegensatz zu Glibenclamid und anderen Sulfonylharnstoffen interagieren Repaglinid und Analoga nur mit Bindungsstellen-Arealen, die SUR1, SUR2A und SUR2B gemeinsam sind und zeigen somit keine Selektivität für die Bindung an einen der Rezeptor-Subtypen. Eine klinische Relevanz der mangelnden SUR1-Selektivität von Repaglinid ist bislang nicht belegt worden.

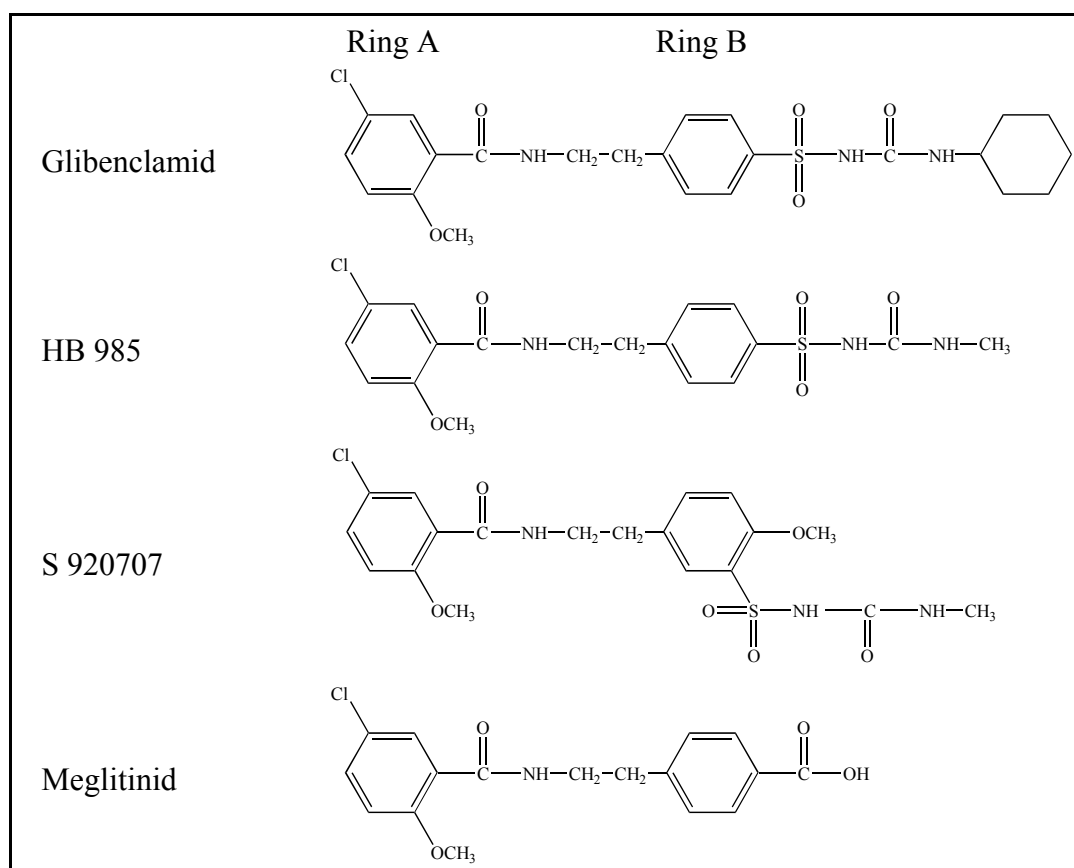
### 5.2.3 SUR2-Selektivität von Sulfonylharnstoff-Derivaten mit meta-ständiger Methyl-(thio)harnstoff-Gruppe

SUR2A-selektive Verbindungen sind von Interesse für die Entwicklung von Pharmaka zur Prävention sogenannter Reentry-Arrhythmien, die dem plötzlichen Herztod vorausgehen können. Eine Verbindung, die selektiv den  $K_{ATP}$ -Kanal in der Plasmamembran von Herzmuskelzellen (SUR2A/ $K_{IR6.2}$ ), nicht aber den in der Mitochondrien-Membran von Herzmuskelzellen sowie den in Gefäßmuskelzellen und B-Zellen blockiert, könnte vor Ischämie-induzierter ventrikulärer Fibrillation schützen (GÖGELEIN et al., 1999; RUSS et al., 2001), ohne Nebenwirkungen auf den Tonus der Gefäßmuskulatur oder die Glucose-Homöostase zu zeigen.

Glibenclamid (Abb. 5.10) bindet mit hoher Affinität an SUR1, jedoch mit einer um den Faktor 500 niedrigeren Affinität an die SUR2-Isoformen (DÖRSCHNER et al., 1999). Die SUR1-Selektivität des Glibenclamids wird bedingt durch den Cyclohexylring, also den voluminösen lipophilen Substituenten am terminalen N-Atom der Sulfonylharnstoff-Gruppe (MEYER et al., 1999). Offenbar ist die Bindungstasche der SUR2-Isoformen kleiner als die von SUR1, so dass große lipophile Reste dort keinen Platz finden.

Durch Ersatz des Cyclohexylrings im Glibenclamid-Molekül durch eine Methylgruppe (HB 985, Abb. 5.10) verringert sich die SUR1-Selektivität, ohne dass SUR2-Selektivität entsteht ( $K_D = 0,6 \mu\text{M}$  für SUR1,  $2,2 \mu\text{M}$  für SUR2A und  $1,8 \mu\text{M}$  für SUR2B; MEYER et al., 1999). Durch meta-Arrangement einer para-ständigen Sulfonylmethylharnstoff-Gruppe zur Ethylaminoseitenkette am Ring B und Einfügen einer Methoxygruppe an der ursprünglichen Position der Sulfonylharnstoff-Gruppe (S 920707, Abb. 5.10) beobachtete man eine Umkehr der Affinitäten. S 920707 zeigte eine 3-4fach höhere Affinität zu SUR2 als zu SUR1 (Tab. 4.3). Der Vergleich der  $K_D$ -Werte für S 920707 mit den entsprechenden  $K_D$ -Werten für HB 985 zeigt, dass die bevorzugte SUR2-Bindung von S 920707 vor allem auf eine geminderte Affinität für SUR1 zurückgeführt werden kann. Dies könnte daran liegen, dass die im Vergleich zu den therapeutisch genutzten Sulfonylharnstoffen (z.B. Glibenclamid) sehr ungewöhnliche Anordnung der Substituenten am Benzolring B eine Interaktion mit den Bindungstaschen-Bereichen von SUR1, welche die anionische Gruppe und den Cyclohexylring des Glibenclamids binden, verhindert. Es ist auffallend, dass die SUR1-Affinität von S 920707 ( $K_D = 15,6 \mu\text{M}$ ) sogar noch etwas geringer war als die von Meglitinid (Abb. 5.10,  $K_D = 6,8 \mu\text{M}$ ; MEYER et al., 1999), welches über keinen Substituenten verfügt, der mit dem Bindungstaschen-Bereich von SUR1 interagieren kann, der den Cyclohexylring des Glibenclamids bindet.





**Abb. 5.10** Strukturformeln von Glibenclamid, HB 985, S 920707 und Meglitinid.

HMR 1402 (Abb. 2.5) unterscheidet sich von S 920707 durch eine zusätzliche Methoxygruppe in para-Stellung zu einer Sulfonylthioharnstoff-Funktion am Ring B. HMR 1402 zeigte zu SUR1 eine doppelt so hohe und zu den SUR2-Isoformen eine 4-mal so hohe Affinität wie S 920707 (Tab. 4.3), erwies sich somit als 2fach SUR2-selektiver ( $K_D(\text{SUR1})/K_D(\text{SUR2A}) \approx 7$ ) als S 920707. Es ist anzunehmen, dass die größere SUR2-Selektivität zumindest zum Teil durch den Austausch von Harnstoff durch Thioharnstoff zustande kommt (GÖGELEIN et al., 1998), während die bessere Bindung an SUR1 (und auch an die SUR2-Isoformen) auf die zusätzlich vorhandene Methoxygruppe zurückzuführen sein könnte, welche die Lipophilie der Verbindung erhöht und somit vermehrt hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Rezeptor ermöglicht.

Sowohl S 920707 als auch HMR 1402 zeigten auch in Experimenten an nativen kardialen und an klonierten pankreatischen  $K_{\text{ATP}}$ -Kanälen eine größere Potenz zum Hemmen der Öffnungswahrscheinlichkeit von SUR2A/ $K_{\text{IR}}6.2$ -Kanälen als von SUR1/ $K_{\text{IR}}6.2$ -Kanälen (ENGLERT et al., 2001). Allerdings erwies sich hierbei S 920707 als deutlich SUR2A-selektiver als HMR 1402. Dieser Unterschied zu den oben genannten Ergebnissen aus Bindungsexperimenten mit Membranpräparationen lässt vermuten, dass bei den funktionellen

Untersuchungen mit intakten Zellen auch noch unterschiedliche Verteilungen von S 920707 und HMR 1402 in das Innere von Herzmuskelzellen bzw. pankreatischen B-Zellen eine Rolle spielen.

Der strukturelle Unterschied von S 981639 (Abb. 2.5) im Vergleich zu S 920707 besteht zum einen in einer um 2 C-Atome verlängerten Kette zwischen den Benzolringen A und B. Außerdem ist der Harnstoff-Teil durch einen Thioharnstoff-Teil ausgetauscht. Schließlich ist noch die zur Methylthioharnstoff-Gruppe ortho-ständige Methoxygruppe vergrößert zur Methoxyethoxy-Gruppe. S 981639 zeigte eine geringfügig niedrigere SUR1-Affinität als S 920707, die Bindungsaffinitäten zu den SUR2-Isoformen erwiesen sich jedoch als etwa 6-mal so hoch (Tab. 4.3). Der errechnete Selektivitätsfaktor  $K_D(\text{SUR1})/K_D(\text{SUR2A}) \approx 36$  überstieg denjenigen von S 920707 um das 10fache. Die stärkere Bindung an SUR2 ist wahrscheinlich teilweise bedingt durch die Thioharnstoff-Gruppe. Eine weitere Ursache für die höhere SUR2-Affinität von S 981639 könnte die verlängerte, die aromatischen Ringe A und B verbindende Kette sein. Vielleicht wird den beiden Ringen A und B durch die Verlängerung des flexiblen Bindungsgliedes eine Position ermöglicht, welche die Wechselwirkung mit SUR2 verbessert. Diese Vorstellung wird gestützt durch die ermittelten Bindungsaffinitäten für SH 951729 ((+)-Enantiomer) und SH 951957 ((-)-Enantiomer). Bei diesen beiden Verbindungen (Abb. 2.5) sind für die beiden aromatischen Ringe A und B die Anordnungsmöglichkeiten zueinander durch den eingefügten Pyranring stark eingeschränkt. Im Fall von SH 951729 wurde dadurch die Interaktion mit den SUR-Subtypen generell verschlechtert, insbesondere aber wurde die Affinität für SUR1 ungewöhnlich niedrig. Daraus resultierte zwar eine ausgeprägte SUR2-Selektivität ( $K_D(\text{SUR1})/K_D(\text{SUR2A}) \approx 39$ ), die Affinität ( $1/K_D$ ) für SUR2A ( $K_D = 16 \mu\text{M}$ ) war aber die niedrigste aller getesteten Substanzen. Es erscheint daher fraglich, ob die Weiterentwicklung von SH 951729 zu einem brauchbaren Antiarrhythmikum führen kann. Im Fall von SH 951957 wurde durch den Pyranring die Affinität für die SUR-Subtypen generell gesteigert. Gegenüber S 920707, dem strukturellen Pendant ohne Pyranring, war die SUR2A-Affinität 27fach gesteigert, bei gleichzeitiger Zunahme der SUR2A-Selektivität ( $K_D(\text{SUR1})/K_D(\text{SUR2A})$ ) von 3,4 auf 14 (Tab. 4.3). Somit könnte SH 951957 Ausgangssubstanz für die Entwicklung eines therapeutisch einsetzbaren Antiarrhythmikums sein. Es stellt sich die Frage, ob diese SUR2-Selektivität durch den Ersatz der Harnstoff- durch eine Thioharnstoff-Gruppe noch weiter verbessert werden könnte.

In funktionellen Untersuchungen von ENGLERT et al. (2001) an kardialen und pankreatischen  $K_{\text{ATP}}$ -Kanälen wies (-)-SH 951957 eine deutlich größere Potenz zum Schließen der Kanäle auf als S 920707 und HMR 1402. Dieser Befund steht in Einklang mit den Ergebnis-

sen der Bindungsexperimente. Es ergab sich allerdings bei den funktionellen Tests an  $K_{ATP}$ -Kanälen keine stärker ausgeprägte SUR2A-Selektivität bei SH 951957 als bei S 920707 und HMR 1402, was wieder ein Hinweis auf eine unterschiedliche Verteilung ins Zellinnere sein könnte. (+)-SH 951729, welches in unseren Bindungsexperimenten am stärksten SUR2A-selektiv war, zeigte bei den funktionellen Tests an  $K_{ATP}$ -Kanälen eine nur geringe SUR2A-Selektivität. Um möglicherweise doch eine deutlich unterschiedliche Wirkpotenz an SUR2A im Vergleich zu SUR1 beobachten zu können, sind wahrscheinlich höhere Konzentrationen an SH 951729 nötig als sie von ENGLERT et al. (2001) eingesetzt wurden.

Resümierend lässt sich die Aussage treffen, dass die SUR1-Affinität eines Liganden durch meta-Arrangement der anionischen Gruppe am Ring B in Kombination mit einem Einbau eines Substituenten an der ursprünglichen Position der anionischen Gruppe abgeschwächt wird, während sich durch Austausch des Harnstoffs durch Thioharnstoff und durch Variation der Verknüpfung zwischen den aromatischen Ringen A und B die SUR2-Selektivität steigern lässt.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Glucose, der physiologisch wichtigste Stimulator der Insulinsekretion, wirkt ebenso wie die als orale Antidiabetika verwendeten Sulfonylharnstoffe und Analoga durch eine Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals der B-Zelle. Glucose kann Insulinsekretion aber noch auf andere Weise auslösen, nämlich auf dem sog.  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Weg der Sekretion. Um letzteren Weg der Insulinsekretion, der bislang noch nicht hinreichend erklärt werden kann, näher zu charakterisieren, sollten die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Insulin-freisetzenden Wirkungen von Substanzen verglichen werden, die von der B-Zelle zur Energieproduktion genutzt werden können. Dazu wurden Maus-Pankreasinseln isoliert und mit Glipizid (Sulfonylharnstoff zur Blockade aller  $K_{ATP}$ -Kanäle) und der jeweiligen Testsubstanz (Glucose,  $\alpha$ -Ketomonocarbonsäuren oder Monomethylsuccinat als Nährstoffe für B-Zellen oder das nicht metabolisierbare Leucin-Analogon (-)-b-BCH als Aktivator der Glutamat-Dehydrogenase) perfundiert. Alle Testsubstanzen bewirkten eine  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion. Bei Inseln, die zuvor ohne jeden Nährstoff, d.h. nur mit Glipizid perfundiert worden waren, löste die zusätzliche Gabe von  $\alpha$ -Ketoisocapronat (20 mM) den stärksten  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Effekt aus.  $\alpha$ -Ketoisovalerat (20 mM) und  $\beta$ -Phenylpyruvat (10 mM) bewirkten eine wesentlich schwächere und kürzer andauernde Insulinsekretion. Glucose (40 mM) induzierte nur einen geringen initialen Anstieg der Sekretionsrate, gefolgt von einem Sekretionsabfall auf das Ausgangsniveau und anschließendem sehr langsamen Wiederanstieg der Sekretionsrate. Um den Energiestatus der B-Zellen zu verbessern, wurden Perfusionen durchgeführt, bei denen außer Glipizid auch kontinuierlich 10 mM Glucose appliziert wurde. Auch unter diesen Bedingungen steigerte  $\alpha$ -Ketoisocapronat (20 mM), ebenso wie  $\alpha$ -Ketocapronat (20 mM), die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Insulinsekretion erheblich stärker als  $\alpha$ -Ketoisovalerat (20 mM),  $\beta$ -Phenylpyruvat (10 mM), (-)-b-BCH (9 mM), Monomethylsuccinat (10 mM) oder zusätzlich gegebene Glucose (30 mM). Es wird gefolgert, dass die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige  $\beta$ -zytotrope Wirkung der Testsubstanzen die Lieferung von Intermediaten ( $\alpha$ -Ketoglutarat, Succinyl-CoA, Succinat, Oxalacetat) an den Citratzyklus und somit eine gesteigerte Umsatzrate des Zyklus erfordert. Die Transaminierung der  $\alpha$ -Ketosäuren und die Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase durch (-)-b-BCH speisen primär  $\alpha$ -Ketoglutarat in den Citratzyklus. Hinsichtlich des Umfangs der Lieferung von Zyklus-Intermediaten unterscheiden sich die  $\alpha$ -Ketosäuren und (-)-b-BCH wahrscheinlich nicht wesentlich. Dagegen können Unterschiede in der Energiegewinnung (d.h. ATP-Produktion) durch den spezifischen Metabolismus dieser Substanzen erklären, wieso die Insulinsekretion unterschiedlich stark und mit unterschiedlicher Kinetik stimuliert wird. Insbesondere steigern  $\alpha$ -Ketoisocapronat und  $\alpha$ -Ketocapronat die

K<sub>ATP</sub>-Kanal-unabhängige Insulinsekretion deshalb am stärksten, weil sie am meisten Acetyl-CoA in den Citratzyklus einspeisen. Potentielle Angriffspunkte von gewonnenem ATP könnten u.a. die Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, der Transport-Mechanismus der insulinhaltigen Sekretionsgranula und das Andocken der Granula an die B-Zellmembran sein.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Interaktion von Sulfonylharnstoffen und Analoga mit K<sub>ATP</sub>-Kanälen zu erstellen. K<sub>ATP</sub>-Kanäle sind zusammengesetzt aus vier Sulfonylharnstoffrezeptor-Untereinheiten (SUR) und vier porenbildenden einwärtsgerichtenden K<sup>+</sup>-Kanal-Untereinheiten (K<sub>IR</sub>6.1 oder K<sub>IR</sub>6.2). Es wurden Bindungsexperimente an Membranen von COS1-Zellen, die SUR1 (SUR-Isoform der B-Zellen), SUR2A oder SUR2B (SUR-Isoform der Herzmuskelzellen bzw. der glatten Muskulatur) enthielten sowie Patch-Clamp-Versuche mit K<sub>ATP</sub>-Kanälen des SUR1/K<sub>IR</sub>6.2-Typs durchgeführt.

Die anionische Funktion im Molekül eines Sulfonylharnstoffs oder Analogons steigert die Bindungsaffinität für Sulfonylharnstoff-Rezeptoren. Eine Carboxylgruppe ist die anionische Funktion des länger bekannten Sulfonylharnstoff-Analogons Meglitinid. Es wurde ein neues Analogon synthetisiert, das sich nur dadurch von Meglitinid unterschied, dass es anstelle der Carboxylgruppe eine Phosphatgruppe besaß (Abb. 2.3 A). Im Vergleich zu Meglitinid zeigte dieses Derivat eine höhere Bindungsaffinität für SUR1 und hemmte K<sub>ATP</sub>-Kanäle des Typs SUR1/K<sub>IR</sub>6.2 mit größerer Potenz. Offenbar ermöglicht eine Phosphatgruppe eine bessere Interaktion mit SUR1 als eine Carboxylgruppe. Dies weist darauf hin, dass phosphorylierte Peptide, im engeren Sinne Peptide mit Tyrosinphosphat-Rest, endogene Liganden für Sulfonylharnstoff-Rezeptoren sein könnten.

Ausgehend vom Benzoesäure-Derivat Meglitinid wurde das Benzoesäure-Derivat Repaglinid entwickelt und kürzlich in die Therapie eingeführt. Es sollte getestet werden, ob Repaglinid und vier weitere verwandte Benzoesäure-Derivate (Abb. 2.4) für SUR1 selektiv sind. Alle getesteten Substanzen banden jeweils mit ähnlicher Affinität an SUR1, SUR2A und SUR2B, waren also für keinen Rezeptor-Subtyp selektiv. Repaglinid und die getesteten Analoga besetzen an Sulfonylharnstoff-Rezeptoren offenbar Bindungsstellen-Bereiche, die für alle drei Subtypen sehr ähnlich sind. Die höchste Affinität zu den Rezeptor-Isoformen zeigte Repaglinid. Die unterschiedlichen Affinitäten der Testsubstanzen für SUR-Bindung können aus Unterschieden in Konfiguration (S-Konfiguration erlaubt eine bessere Anpassung an die Bindungsstelle) und Substitutionsmuster (eine Alkylgruppe an der die beiden aromatischen Ringe A und B verbindenden Kette und eine Ethoxygruppe am Ring B sind von Vorteil für die Bindungsaffinität) abgeleitet werden.

Das als orales Antidiabetikum eingesetzte Glibenclamid bindet mit 100-1000fach höherer Affinität an SUR1 als an SUR2A und SUR2B. Ausgehend vom Glibenclamid-Molekül wird versucht, SUR2A-selektive Derivate zu entwickeln, die therapeutisches Potential als Antiarrhythmika besitzen. Es wurden fünf neue Derivate (Abb. 2.5; ENGLERT et al., 2001) getestet, die sich alle in Bindungsexperimenten als SUR2-selektiv erwiesen. Die SUR1-Affinität eines Liganden wurde durch meta-Arrangement der anionischen Gruppe am aromatischen Ring B in Kombination mit dem Einbau eines Substituenten an der ursprünglichen para-Position der anionischen Gruppe abgeschwächt. Ferner ließ sich durch Austausch des Harnstoffs in der Sulfonylharnstoff-Gruppe durch Thioharnstoff und durch Variation der Verknüpfung zwischen den aromatischen Ringen A und B die SUR2-Selektivität steigern.

## 7 LITERATUR

- AGUILAR-BRYAN L, NICHOLS CG, WECHSLER SW, CLEMENT JP IV, BOYD AE III, GONZALEZ G, HERRERA-SOSA H, NGUY K, BRYAN J, NELSON DA (1995): Cloning of the  $\beta$  cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. *Science* 268: 423-426.
- AIZAWA T, SATO Y, KOMATSU M, HASHIZUME K (1992): ATP-sensitive  $K^+$  channel-independent, insulinotropic action of glucose in the B-cells. *Endocr Regul* 26: 159-162.
- ANTINOZZI PA, SEGALL L, PRENTKI M, MCGARRY JD, NEWGARD CB (1998): Molecular or pharmacologic perturbation of the link between glucose and lipid metabolism is without effect on glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 273: 16146-16154.
- ASHCROFT FM, ASHCROFT SJ, HARRISON DE (1987): Effects of 2-ketoisocaproate on insulin release and single potassium channel activity in dispersed rat pancreatic  $\beta$ -cells. *J Physiol* 385: 517-529.
- ASHCROFT FM (1988): Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci* 11: 97-118.
- ASHCROFT FM, RORSMAN P (1989): Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54: 87-143.
- ASHCROFT FM, PROKS P, SMITH PA, AMMALA C, BOKVIST K, RORSMAN P (1994): Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* 55: 54-65.
- ASHCROFT SJH, ASHCROFT FM (1990): Properties and functions of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Cell signal* 2: 197-214.
- ASHFIELD R, GRIBBLE FM, ASHCROFT SJ, ASHCROFT FM (1999): Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K(ATP) channel. *Diabetes* 48: 1341-1347.
- AUGUSTINE GJ, BURNS ME, DEBELLO WM, PETTIT DL, SCHWEIZER FE (1996): Exocytosis: proteins and perturbations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 659-701.
- BABENKO AP, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (1998): A view of SUR/ $K_{IR6.x}$ ,  $K_{ATP}$ -channels. *Annu Rev Physiol* 60: 667-687.
- BAHL JJ, MATSUDA M, DEFROZO RA, BRESSLER R (1997): In vitro and in vivo suppression of gluconeogenesis by inhibition of pyruvate carboxylase. *Biochem Pharmacol* 53: 67-74.
- BENNET JP (1978): Methods in binding studies. In: *Neurotransmitter Receptor Binding*; hrsg. v. Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ. Raven Press, New York 1978: 57-90.
- BENNET PH (1990): Epidemiology of diabetes mellitus. In: *Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus*; hrsg. v. Rifkin H, Porte D Jr. Elsevier, New York: 363-377.
- BERTRAND G, ISHIYAMA N, NENQUIN M, RAVIER MA, HENQUIN JC (2002): The elevation of glutamate content and the amplification of insulin secretion in glucose-stimulated pancreatic islets are not causally related. *J Biol Chem* 277: 32883-32891.

- BEST L, MILEY HE, YATES AP (1996): Activation of an anion conductance and beta-cell depolarization during hypotonically induced insulin release. *Exp Physiol* 81: 927-933.
- BEST L (1997): Glucose and  $\alpha$ -ketoisocaproate induce transient inward currents in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 40: 1-6.
- BEST L (2002): Evidence that glucose-induced electrical activity in rat pancreatic b-cells does not require  $K_{ATP}$  channel inhibition. *J Membr Biol* 185: 193-200.
- BHATT HS, CONNER BP, PRASANNA G, YORIO T, EASOM RA (2000): Dependence of insulin secretion from permeabilized pancreatic beta-cells on the activation of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. A re-evaluation of inhibitor studies. *Biochem Pharmacol* 60: 1655-1663.
- BRÖER S, SCHNEIDER H-P, BRÖER A, RAHMAN B, HAMPRECHT B, DEITMER J (1998): Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem J* 333: 167-174.
- BRÖER S, BRÖER A, SCHNEIDER H-P, STEGEN C, HALESTRAP AP, DEITMER JW (1999): Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 341: 529-535.
- CHENG YC, PRUSOFF WH (1973): Relationship between the inhibition konstant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22: 3099-3108.
- CHRISTENSEN HN, CULLEN AM (1969): Behavior in the rat of a transport-specific, bicyclic amino acid. Hypoglycemic action. *J Biol Chem* 244: 1521-1526.
- CHRISTENSEN HN, HANDLOGTEN ME, LAM I, TAGER HS, ZAND R (1969): A bicyclic amino acid to improve discriminations among transport systems. *J Biol Chem* 244: 1510-1520.
- CHRISTENSEN HN, HELLMAN B, LERNMARK A, SEHLIN J, TAGER HS, TÄLJEDAL IB (1971): In vitro stimulation of insulin release by non-metabolizable, transport-specific amino acids. *Biochim biophys Acta* 241: 341-348.
- CHUTKOW WA, SIMON MC, LE BEAU MM, BURANT CF (1996): Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular  $K_{ATP}$  channels. *Diabetes* 45: 1439-1445.
- CLEMENT JP IV, KUNJILWAR K, GONZALEZ G, SCHWANSTECHE M, PANTEN U, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (1997): Association and stoichiometry of  $K_{ATP}$  channel subunits. *Neuron* 18: 827-838.
- COCKBURN BN, OSTREGA DM, STURIS J, KUBSTRUP C, POLONSKY KS, BELL GI (1997): Changes in pancreatic islet glucokinase and hexokinase activities with increasing age, obesity and the onset of diabetes. *Diabetes* 46: 1434-1439.
- CONTI LR, RADEKE CM, SHYNG SL, VANDENBERG CA (2001): Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 276: 41270-41278.
- COOK DL, HALES CN (1984): Intracellular ATP directly blocks  $K^+$  channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311: 271-273.



- COOK DL, SATIN LS, ASHFORD MLJ, HALES CN (1988): ATP-sensitive  $K^+$  channels in pancreatic B-cells. Spare channel hypothesis. *Diabetes* 37: 495-498.
- CORKEY BE, MARTIN-REQUERO A, BRANDT M, WILLIAMSON JR (1981): Regulation of  $\alpha$ -ketoisocaproate and  $\alpha$ -ketoisovalerate metabolism and their interactions with the citric acid cycle in isolated hepatocytes. In: *Metabolism and clinical implications of branched chain amino and ketoacids*; hrsg. v. Walser, Williamson. Elsevier/North Holland, Amsterdam: 119-127.
- CORKEY BE, DEENEY JT, YANEY GC, TORNHEIM K, PRENTKI M (2000): The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in  $\beta$ -cell signal transduction. *J Nutr* 130 (Suppl.): 299S-304S.
- CURRY DL, BENNETT LL, GRODSKY GM (1968): Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinol* 83: 572-584.
- DABROWSKI M, WAHL P, HOLMES WE, ASHCROFT FM (2001): Effect of repaglinide on cloned beta cell, cardiac and smooth muscle types of ATP-sensitive potassium channels. *Diabetologia* 44: 747-756.
- DAVIES NW, STANDEN NB, STANFIELD PR (1991): ATP-dependent potassium channels of muscle cells: their properties, regulation, and possible functions. *J Bioenerg Biomembr* 23: 509-535.
- DETIMARY P, VAN DEN BERGHE G, HENQUIN JC (1996): Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J Biol Chem* 271: 20559-20565.
- DÖRSCHNER H, BREKARDIN E, UHDE I, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M (1999): Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Mol Pharmacol* 55: 1060-1066.
- DOSTOU J, GERICH J (2001): Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 (Suppl. 2): S149-S156.
- DUNNE MJ, HARDING EA, JAGGAR JH, SQUIRES PE (1994): Ion channels and the molecular control of insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 22: 6-12.
- EASOM RA (1999): CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. *Diabetes* 48: 675-684.
- ELIASSEN L, RENSTROM E, DING WG, PROKS P, RORSMAN P (1997): Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes  $Ca^{2+}$ -induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 503: 399-412.
- ENGLERT HC, GERLACH U, GÖGELEIN H, HARTUNG J, HEITSCH H, MANIA D, SCHEIDLER S (2001): Cardiosensitive  $K_{ATP}$  channel blockers derived from a new series of m-anisamidoethylbenzenesulfonylthioureas. *J Med Chem* 44: 1085-1098.
- FABIATO A (1988): Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Meth Enzymol* 157: 378-417.

- FARFARI S, SCHULZ V, CORKEY B, PRENTKI M (2000): Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic  $\beta$ -cells. Possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49: 718-726.
- FERNER R, NEIL H (1988): Sulfonylureas and hypoglycaemia. *Br Med J* 296: 949-950.
- FINDLAY I (1987): The effects of magnesium upon adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in a rat insulin-secreting cell line. *J Physiol* 391: 611-629.
- FUHLENDORFF J, RORSMAN P, KOFOD H, BRAND CL, ROLIN B, MACKAY P, SHYMKO R, CARR RD (1998): Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes. *Diabetes* 47: 345-351.
- FUJITA T, SETO Y, KONDO N, KATO R (1996): Studies on the N-[(trans-4-isopropyl-cyclohexyl)-carbonyl]-D-phenylalanine (A-4166) receptor in HIT T-15 cells. *Biochem Pharmacol* 52: 407-411.
- GAINES KL, HAMILTON S, BOYD AE III (1988): Characterization of the sulfonylurea receptor on beta cell membranes. *J Biol Chem* 263: 2589-2592.
- GEISEN K, HITZEL V, ÖKOMONOPOULOS R, PÜNTER J, WEYER R, SUMM HD (1985): Inhibition of  $^3\text{H}$ -glibenclamide binding to sulfonylurea receptors by oral antidiabetics. *Arzneimittelforsch* 35: 707-712.
- GEISS LS, HERMAN WH, SMITH PJ (1995): Mortality in non-insulin-dependent diabetes. In: *Diabetes in America*. 2<sup>nd</sup> edition. NIH Publication 95-1468: 233-250.
- GEMBAL M, GILON P, HENQUIN JC (1992): Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 89: 1288-1295.
- GEMBAL M, DETIMARY P, GILON P, GAO ZY, HENQUIN JC (1993): Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive  $\text{K}^+$  channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 91: 871-880.
- GIBSON GE, BLASS JP (1976): Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple-syrup-urine disease metabolites. *J Neurochem* 26: 1073-1078.
- GLUZMAN Y (1981): SV 40-transformed simian cells support the replication of early SV 40 mutants. *Cell* 23: 175-182.
- GÖGELEIN H, HARTUNG J, ENGLERT HC, SCHÖLKENS BA (1998): HMR 1883, a novel cardioselective inhibitor of the ATP-sensitive potassium channel. Part I: Effects on cardiomyocytes, coronary flow and pancreatic  $\beta$ -cells. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1453-1464.
- GÖGELEIN H, HARTUNG J, ENGLERT HC (1999): Molecular basis, pharmacology and physiological role of cardiac  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. *Cell Physiol Biochem* 9: 227-241.
- GOPALAKRISHNAN M, JANIS RA, TRIGGLE DJ (1993): ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels: Pharmacologic properties, regulation and therapeutic potential. *Drug Dev Res* 28: 95-127.

- GORUS FK, SCHUIT FC, IN'T VELD PA, GEPTS W, PIPELEERS DG (1988): Interaction of sulfonylureas with pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 37: 1090-1095.
- GROOP LC, RATHEISER K, LUZI L, MELANDER A, SIMONSON DC, PETRIDES A, BONADONNA RC, WIDEN E, DEFRONZO RA (1991): Effect of sulphonylurea on glucose-stimulated insulin secretion in healthy and non-insulin dependent diabetic subjects: A dose-response study. *Acta Diabetol* 28: 162-168.
- GROSS GJ, AUCHAMPACH JA (1992): Role of ATP dependent potassium channels in myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* 26: 1011-1016.
- GROSS I, TOMAN A, UHDE I, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M (1999): Stoichiometry of potassium channel opener action. *Mol Pharmacol* 56: 1370-1373.
- GROVER GJ (1994): Protective effects of ATP-sensitive potassium-channel openers in experimental myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 24 (suppl. 4): S18-S27.
- GYLFE E (1976): Comparison of the effects of leucine, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase. *Acta diabetol lat* 13: 20-24.
- HALESTRAP AP, PRICE NT (1999): The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343: 281-299.
- HAMBROCK A, LÖFFLER-WALZ C, KURACHI Y, QUAST U (1998):  $Mg^{2+}$  and ATP dependence of  $K_{ATP}$  channel modulator binding to the recombinant sulfonylurea receptor, SUR2B. *Br J Pharmacol* 125: 577-583.
- HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85-100.
- HARRIS MI, FLEGEL KM, COWIE CC, EBERHART MS, GOLDSTEIN DE, LITTLE RR, WIEDMEYER HM, BYRD-HOLT DD (1998): Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired tolerance in US adults. *Diabetes Care* 21: 518-524.
- HAYAKAWA T, SHIRAKI T, MORIMOTO T, SHII K, IKEDA H (1996): Pioglitazone improves insulin signaling defects in skeletal muscle from Wistar fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 439-444.
- HENQUIN JC (1987): Regulation of insulin release by ionic and electrical events in  $\beta$ -cells. *Hormone Res* 27: 168-178.
- HENQUIN JC (2000): Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751-1760.
- HENRIKSEN JE, ALFORD F, HANDBERG A, VAAG A, WARD GM, KALFAS A, BECK-NIELSEN H (1994): Increased glucose effectiveness in normo-glycemic but insulin-resistant relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a novel compensatory mechanism. *J Clin Invest* 94: 1196-1204.
- HIGGINS CF (1992): ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113.

- HIGGINS CF (1995): The ABC of channel regulation. *Cell* 82: 693–696.
- HU S, WANG S, FANELLI B, BELL PA, DUNNING BE, GEISSE S, SCHMITZ R, BOETTCHER BR (2000): Pancreatic  $\beta$ -cell  $K_{ATP}$  channel activity and membrane-binding studies with nateglinide: a comparison with sulfonylureas and repaglinide. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 444-452.
- HUGHES SJ, FAEHLING M, THORNELEY CW, PROKS P, ASHCROFT FM, SMITH PA (1998): Electrophysiological and metabolic characterization of single  $\beta$ -cells and islets from diabetic GK rats. *Diabetes* 47: 73-81.
- HUTSON SM, RANNELS SL (1985): Characterization of a mitochondrial transport system for branched chain  $\alpha$ -keto acids. *J Biol Chem* 260: 14189-14193.
- HUTSON SM, ROTEN S, KAPLAN RS (1990): Solubilization and functional reconstitution of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid transporter from rat heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1028-1031.
- HUTTON JC, SENER A, MALAISSE WJ (1979): The metabolism of 4-methyl-2-oxopentanoate in rat pancreatic islets. *Biochem J* 184: 291-301.
- ICHIHARA A, NODA C, GOTO M (1975): Transaminase of branched chain amino acids. X. High activity in stomach and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 67: 1313-1318.
- IKENOUE T, OKAZAKI K, FUJITANI S, TSUCHIYA Y, AKIYOSHI M, TOSHIO M, KONDO N (1997): Effect of a new hypoglycaemic agent, A-4166 [(-)-N-(trans-4-isopropylcyclohexanecarbonyl)-D-phenylalanine], on postprandial blood glucose excursion: comparison with voglibose and glibenclamide. *Biol Pharm Bull* 20: 354-359.
- INAGAKI N, GONOI T, CLEMENT JP IV, NAMBA N, INAZAWA J, GONZALEZ G, AGUILAR-BRYAN L, SEINO S, BRYAN J (1995): Reconstitution of  $I_{KATP}$ : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270: 1166-1170.
- INAGAKI N, GONOI T, CLEMENT JP IV, WANG CZ, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J, SEINO S, (1996): A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Neuron* 16: 1011-1017.
- INAGAKI N, GONOI T, SEINO S (1997): Subunit stoichiometry of the pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive  $K^+$  channel. *FEBS Lett* 409: 232-236.
- ISOMOTO S, KONDO C, YAMADA M, MATSUMOTO S, HIGASHIGUCHI O, HORIO Y, MATSUZAWA Y, KURACHI Y (1996): A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive  $K^+$ -channel. *J Biol Chem* 271: 24321-24324.
- JACKSON RH, SINGER TP (1983): Inactivation of the 2-ketoglutarate and pyruvate dehydrogenase complexes of beef heart by branched chain keto acids. *J Biol Chem* 258: 1857-1865.
- JACKSON VN, HALESTRAP AP (1996): The kinetics, substrate, and inhibitor specificity of the monocarboxylate (lactate) transporter of rat liver cells determined using the fluorescent intracellular pH indicator, 2', 7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein. *J Biol Chem* 271: 861-868.

- JANKA HU, REDAELLI M, GANDJOUR A, GIANI G, HAUNER H, MICHAELIS D, STANDL E (2000): Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. In: *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG*; hrsg. v. Scherbaum WA, Lauterbach KW, Renner R. Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Düsseldorf; 1: 13-30.
- JIANG C, XIA Y, HADDAD GG (1992): Role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels during anoxia: Major differences between rat (newborn and adult) and turtle neurons. *J Physiol (Lond)* 448: 599-612.
- KIKUCHI M (1996): Modulation of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus by two novel oral hypoglycaemic agents, NN623 and A4166. *Diabet Med* 13 (suppl. 6): S151-S155.
- KILPATRICK ED, ROBERTSON RP (1998): Differentiation between glucose-induced desensitization of insulin secretion and  $\beta$ -cell exhaustion in the HIT-T15 cell line. *Diabetes* 47: 606-611.
- KINARD TA, SATIN LS (1995): An ATP-sensitive Cl<sup>-</sup> channel current that is activated by cell swelling, cAMP, and glyburide in insulin-secreting cells. *Diabetes* 44: 1461-1466.
- KING J, NICHOLSON T (1939): The preparation of phenyl phosphoric esters. *Biochem J* 33: 1182-1184.
- KOMATSU M, SCHERMERHORN T, NODA M, STRAUB SG, AIZAWA T, SHARP GWG (1997): Augmentation of insulin release by glucose in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>: new insights into stimulus-secretion coupling. *Diabetes* 46: 1928-1938.
- LACY PE, KOSTIANOVSKY M (1967): Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39.
- LAMBE KG, TUGWOOD JD (1996): A human peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma is activated by inducers of adipogenesis, including thiazolidinedione drugs. *Eur J Biochem* 239: 1-7.
- LANG U, LINN T (2001): Gestationsdiabetes. In: *Diabetologie kompakt*; hrsg. v. Schatz H. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien: 174-178.
- LARSSON O, DENNEY JT, BRÄNSTRÖM R, BERGGREN PO, CORKEY BE (1996): Activation of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic  $\beta$ -cell glucose sensitivity. *J Biol Chem* 271: 10623-10626.
- LAZDUNSKI M (1996): Ion channel effects of antidiabetic sulfonylureas. *Horm Metab Res* 28: 488-495.
- LEE SH, DAVIS EJ (1986): Amino acid catabolism by perfused rat hindquarter. The metabolic fates of valine. *Biochem J* 233: 621-630.
- LEHMANN JM, MOORE LB, SMITH-OLIVER TA, WILKISON WO, WILLSON TM, KLIEWER SA (1995): An antidiabetic thiazolidinedione as a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). *J Biol Chem* 270: 12953-12956.
- LEMBERT N, IDAHL L-Å (1998):  $\alpha$ -Ketoisocaproate is not a true substrate for ATP production by pancreatic  $\beta$ -cell mitochondria. *Diabetes* 47: 339-344.

- LENZEN S, PANTEN U (1981): Effects of pyruvate, L-lactate, and 3-phenylpyruvate on function of ob/ob mouse pancreatic islets: insulin secretion in relation to  $45\text{Ca}^{2+}$  uptake and metabolism. *Biochem Med* 25: 366-372.
- LENZEN S, FORMANEK H, PANTEN U (1982): Signal function of metabolism of neutral amino acids and 2-keto acids for initiation of insulin secretion. *J Biol Chem* 257: 6631-6633.
- LENZEN S, RUSTENBECK I, PANTEN U (1984): Transamination of 3-phenylpyruvate in pancreatic B-cell mitochondria. *J Biol Chem* 259: 2043-2046.
- LENZEN S, SCHMIDT W, PANTEN U (1985): Transamination of neutral amino acids and 2-keto acids in pancreatic B-cell mitochondria. *J Biol Chem* 260: 12629-12634.
- LENZEN S, SCHMIDT W, RUSTENBECK I, PANTEN U (1986): 2-Ketoglutarate generation in pancreatic B-cell mitochondria regulates insulin secretory action of amino acids and 2-keto acids. *Biosci Reports* 6: 163-169.
- LERNMARK A (1974): The preparation of and studies on free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 10: 431-438.
- LUDWIG U (1991): Untersuchungen an isolierten Langerhans'schen Inseln zur Nährstoff-induzierten Insulinsekretion bei durch Sulfonylharnstoffe blockiertem ATP-gesteuertem  $\text{K}^+$ -Kanal. *Dissertation*, Universität Göttingen.
- MACDONALD MJ, FAHIEN LA (1988): Glyceraldehyde phosphate and methyl esters of succinic acid. Two "new" potent insulin secretagogues. *Diabetes* 37: 997-999.
- MACDONALD MJ (1993): Metabolism of the insulin secretagogue methyl succinate by pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys* 300: 201-205.
- MACDONALD MJ (1995): Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. *J Biol Chem* 270: 20051-20058.
- MACDONALD MJ, FAHIEN LA (2000): Glutamate is not a messenger in insulin secretion. *J Biol Chem* 275: 34025-34027.
- MAECHLER P, WOLLHEIM CB (1999): Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402: 685-689.
- MALAISSÉ WJ, MALAISSÉ-LAGAE F, MAYHEW DA, WRIGHT PH (1967): Effects of sulfonylureas upon insulin secretion by the rat's pancreas. In: *Tolbutamide after ten years*; hrsg. v. Butterfield WJH, von Westering W. *Experta Medica*, Amsterdam: 49-60.
- MALAISSÉ WJ, SENER A, CARPINELLI AR, ANJANEYYULU K, LEBRUN P, HERCHUELZ A, CHRISTOPHE J (1980): The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XLVI. Physiological role of L-glutamine as a fuel for pancreatic islets. *Mol Cell Endocrin* 20: 171-189.
- MALAISSÉ WJ, SENER A, WELSH M, MALAISSÉ-LAGAE F, HELLERSTRÖM C, CHRISTOPHE J (1983): Mechanism of 3-phenylpyruvate-induced insulin release. Metabolic aspects. *Biochem J* 210: 921-927.

- MARKWORTH E, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M (2000): ATP<sup>4-</sup> mediates closure of pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes* 49: 1413-1418.
- MATSCHINSKY FM, LANDGRAF R, ELLERMANN J, KOTLER-BRAJTURG PD (1972): Glucoreceptor mechanisms in islets of Langerhans. *Diabetes* 21 (suppl. 2): 555-571.
- MATSCHINSKY FM, ELLERMAN J, STILLINGS S, RAYBAUD F, PACE C, ZAWALICH W (1975). In: *Handbook of Experimental Pharmacology*; hrsg. v. Hasselblatt A, von Bruchhausen, F. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; 32: 79-114.
- MATSCHINSKY FM (1996): A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45: 223-241.
- MERTZ RJ, WORLEY JF, SPENCER B, JOHNSON J, DUKES ID (1996): Activation of stimulus-secretion coupling in pancreatic  $\beta$ -cells by specific products of glucose metabolism. *J Biol Chem* 271: 4838-4845.
- MEYER M, CHUDZIAK F, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M, PANTEN U (1999): Structural requirements of sulphonylureas and analogues for interaction with sulphonylurea receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 128: 27-34.
- MIKHAILOV MV, MIKHAILOVA EA, ASHCROFT SJH (2001): Molecular structure of the glibenclamide binding site of the  $\beta$ -cell K<sub>ATP</sub> channel. *FEBS Lett* 499: 154-160.
- MISLER S, FALKE LC, GILLIS K, MCDANIEL ML (1986): A metabolite-regulated potassium channel in rat pancreatic B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7119-7123.
- MOSKALEWSKI S (1965): Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen comp Endocr* 5: 342-353.
- NICHOLS CG, LEDERER WJ (1991): Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol* 261: H1675-H1686.
- NOMA A (1983): ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147-148.
- OHNO-SHOSAKU, T, ZÜNKLER BJ, TRUBE G (1987): Dual effects of ATP on K<sup>+</sup> currents of mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflügers Arch* 408: 133-138.
- O'RAHILLY S (2001): Uncoupling protein 2: adiposity angel and diabetes devil? *Nature Med* 7: 770-771.
- OWEN OE, KALHAN SC, HANSON RW (2002): The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 277: 30409-30412.
- PANTEN U, v. KRIEGSTEIN E, POSER W, SCHÖNBORN J, HASSELBLATT A (1972): Effects of L-leucine and  $\alpha$ -ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS Lett* 20: 225-228.
- PANTEN U (1975): Effects of alpha-ketomonocarboxylic acids upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 291: 405-420.

- PANTEN U, ISHIDA H, SCHAUDER P, FRERICH S, HASSELBLATT A (1977): A versatile micro-perfusion system. *Analyt Biochem* 82: 317-326.
- PANTEN U, HOLZE S, LENZEN S (1980): Changes of function and metabolism of the pancreatic B-cell caused by amino acids and related compounds. In: *Biochemistry and biophysics of the pancreatic B-cell*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York: 27-30.
- PANTEN U, LANGER J (1981): Mechanism of 3-phenylpyruvate-induced insulin release from isolated pancreatic islets. *Biochem J* 198: 353-356.
- PANTEN U, KLEIN H (1982): O<sub>2</sub> Consumption by isolated pancreatic islets, as measured in a microincubation system with a clark-type electrode. *Endocrinol* 111: 1595-1600.
- PANTEN U, ZIELMANN S, JOOST H-G, LENZEN S (1984): Branched chain amino and keto acids - tools for the investigation of fuel recognition mechanism in pancreatic B-cells. In: *Branched chain amino and keto acids in health and disease*; hrsg. v. Adibi SA, Fekl W, Langenbeck U, Schauder P. Karger Verlag, Basel: 134-146.
- PANTEN U, ZÜNKLER BJ, SCHEIT S, KIRCHHOFF K, LENZEN S (1986): Regulation of energy metabolism in pancreatic islets by glucose and tolbutamide. *Diabetologia* 29: 648-654.
- PANTEN U (1987): Rapid control of insulin secretion from pancreatic islets. *ISI Atlas Sci: Pharmacol* 1: 307-310.
- PANTEN U, LENZEN S (1988): Alterations in energy metabolism of secretory cells. In: *Energetics of secretion responses*; hrsg. v. Akkerman J-W N. CRC Press, Boca Raton, Florida; 2: 110-123.
- PANTEN U, SCHWANSTECHER M, WALLASCH A, LENZEN S (1988): Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 338: 459-462.
- PANTEN U, BURGFELD J, GOERKE F, RENNICK M, SCHWANSTECHER M, WALLASCH A, ZÜNKLER BJ, LENZEN S (1989): Control of insulin secretion by sulfonylureas, meglitinide and diazoxide in relation to their binding to the sulfonylurea receptor in pancreatic islets. *Biochem Pharmacol* 38: 1217-1229.
- PANTEN U, HEIPEL C, ROSENBERGER F, SCHEFFER K, ZÜNKLER BJ, SCHWANSTECHER C (1990): Tolbutamide-sensitivity of the adenosine-5'-triphosphate-dependent K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic B-cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342: 566-574.
- PANTEN U, SCHWANSTECHER M, SCHWANSTECHER C (1992): Pancreatic and extrapancreatic sulfonylurea receptors. *Horm Metabol Res* 24: 549-554.
- PANTEN U, SCHWANSTECHER M, SCHWANSTECHER C (1996): Mode of action of sulfonylureas. In: *Handbook of experimental pharmacology, Oral antidiabetics*; hrsg. v. Kuhlmann J, Puls W. Springer-Verlag Berlin; 119:129-159.
- PAXTON R, HARRIS RA, SENER A, MALAISSE WJ (1988): Branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase activity in isolated rat pancreatic islets. *Horm Metabol Res* 20: 317-322.



- PETRIDES PE (1997): Stoffwechsel der Aminosäuren. In: *Biochemie und Pathobiochemie*; hrsg. v. Löffler G, Petrides PE. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg: 521-580.
- PFEIFFER AFH (2001): Die verschiedenen Formen der Zuckerkrankheit und deren Genetik. In: *Diabetologie kompakt*; hrsg. v. Schatz H. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien: 5-13.
- PICK A, CLARK J, KUBSTRUP C, LEVISETTI M, PUGH W, BONNER-WEIR S, POLONSKY KS (1998): Role of apoptosis in failure of  $\beta$ -cell mass compensation for insulin resistance and  $\beta$ -cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 47: 358-364.
- PRENTKI M, VISCHER S, GLENNON MC, REGAZZI R, DEENEY JT, CORKEY BE (1992): Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 267: 5802-5810.
- PRESSEL DM, MISLER S (1990): Sodium channels contribute to action potential generation in canine and human pancreatic islet B cells. *J Membr Biol* 116: 273-280.
- RAAB-GRAHAM KF, CIRILO LJ, BOETTCHER AA, RADEKE CM, VANDENBERG CA (1999): Membrane topology of the amino-terminal region of the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem* 274: 29122-29129.
- RANDLE PJ, FATANIA HR, LAU KS (1984): Regulation of the mitochondrial branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex of animal tissues by reversible phosphorylation. In: *Enzyme regulation by reversible phosphorylation - further advances*; hrsg. v. Cohen. Elsevier/North Holland, Amsterdam: 1-26.
- REPKE H, LIEBMANN C (1987): Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- RORSMAN P, RENSTRÖM E (1999): Glutamate primes the pump. *Nature* 402: 595-596.
- RUSS U, LANGE U, LÖFFLER-WALZ C, HAMBROCK A, QUAST U (2001): Interaction of the sulfonylthiourea HMR 1883 with sulfonylurea receptors and recombinant ATP-sensitive  $K^+$  channels: comparison with glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 1049-1055.
- RUSTENBECK I, HERRMANN C, GRIMMSMANN T (1997): Energetic requirement of insulin secretion distal to calcium influx. *Diabetes* 46: 1305-1311.
- RUSTENBECK I (1999): Die Stimulus-Sekretions-Kopplung in den B-Zellen des Pankreas: Von der Physiologie zur Pharmakologie. *Diabetes und Stoffwechsel* 8: 217-222.
- RUSTENBECK I (2002): Desensitization of insulin secretion. *Biochem Pharmacol* 63: 1921-1935.
- RUSTIN P, BOURGERON T, PARFAIT B, CHRETIEN D, MUNNICH A, ROTIG A (1997): Inborn errors of the Krebs cycle: a group of unusual mitochondrial diseases in human. *Biochim et Biophys Acta* 1361: 185-197.
- SALTIEL AR (2001): New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104: 517-529.

- SANDOUK T, REDA D, HOFMANN C (1993): The antidiabetic agent pioglitazone increases expression of glucose transporters in 3T3-F442A cells by increasing messenger ribonucleic acid transcript stability. *Endocrinol* 133: 352-359.
- SATIN LS, COOK DL (1988): Evidence for two calcium currents in insulin-secreting cells. *Pflüger's Arch* 411: 401-409.
- SATIN LS, SMOLEN PD (1994): Electrical bursting in  $\beta$ -cells of the pancreatic islets of Langerhans. *Endocrine* 2: 677-687.
- SCHMELING H, PANTEN U (2002): Direct interaction of  $\alpha$ -ketoisocaproic acid and related compounds with sulfonylurea receptors. *Diabetes und Stoffwechsel* 11 (suppl. 1): 21, V-46.
- SCHMID-ANTOMARCHI H, DE WEILLE J, FOSSET M, LAZDUNSKI M (1987): The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated  $K^+$ -channel in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 262: 15840-15844.
- SCHWANSTECHER M, BEHREND S, BRANDT C, PANTEN U (1992): The binding properties of the solubilized sulfonylurea receptor from a pancreatic B-cell line are modulated by the  $Mg^{++}$ -complex of ATP. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 495-502.
- SCHWANSTECHER M, SCHWANSTECHER C, DICKEL C, CHUDZIAK F, MOSHIRI A, PANTEN U (1994): Location of the sulphonylurea receptor at the cytoplasmic face of the beta-cell membrane. *Br J Pharmacol* 113: 903-911.
- SCHWANSTECHER M, SIEVERDING C, DÖRSCHNER H, GROSS I, AGUILAR-BRYAN L, SCHWANSTECHER C, BRYAN J (1998): Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* 17: 5529-5535.
- SEGHERS V, NAKAZAKI M, DEMAYO F, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (2000): SUR1 knockout mice: a model for  $K_{ATP}$  channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 275: 9270-9277.
- SENER A, MALAISSE WJ (1980): L-Leucine and a non-metabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* 288: 187-189.
- SENER A, MALAISSE WJ (1984): Nutrient metabolism in islet cells. *Experientia* 40: 1026-1035.
- SENER A, MALAISSE WJ (1991): Hexose metabolism in pancreatic islets. Effect of (-)-hydroxycitrate upon fatty acid synthesis and insulin release in glucose stimulated islets. *Biochimie* 73: 1287-1290.
- STURGESS NC, ASHFORD MLJ, COOK DL, HALES CN (1985): The sulfonylurea receptor may be an ATP-sensitive  $K^+$  channel. *Lancet* 2: 474-475.
- TIETZE LF, EICHER T (1981): Synthese von  $(\pm)$ -1,1'-Binaphthyl-2,2'-phosphorsäure. In: *Reaktionen und Synthesen im organisch-chemischen Praktikum*; hrsg. v. Tietze LF, Eicher T. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York: 394-395.
- TOMAN A (2001): Lokalisation der Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe auf Sulfonylharnstoffrezeptoren. *Dissertation*, TU Braunschweig.

- TRONIER B, MARBURY TC, DAMSBO P, WINDFELD K (1995): A new oral hypoglycaemic agent, repaglinide, minimises risk of hypoglycaemia in well-controlled NIDDM patients. *Diabetologia* 38 (suppl. 1): A195.
- TRUBE G, RORSMAN P, OHNO-SHOSAKU T (1986): Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent  $K^+$ -channel in mouse pancreatic B-cell. *Pflügers Arch* 407: 493-499.
- TUCKER SJ, GRIBBLE FM, ZHAO C, TRAPP S, ASHCROFT FM (1997): Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive  $K^+$ -channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 387: 179-183.
- TUSNÁDY GE, BAKOS E, VARADI A, SARKADI B (1997): Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* 402: 1-3.
- UHDE I, TOMAN A, GROSS I, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M (1999): Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* 274: 28079-28082.
- UNGER RH (1995): Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. *Diabetes* 44: 863-870.
- VAN HAEFTEN TW, ZONDERLAND ML, DUBBELDAM S, ERKELENS DW (1998): Insulin secretion in normal glucose-tolerant relatives of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 21: 278-282.
- WALLENSTEIN S, ZUCKLER CL, FLEISS JL (1980): Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47: 1-9.
- WILLIAMSON JR, CORKEY BE, MARTIN-REQUERO A, WALAJTYS-RODE E, COLL KE (1984):  $\alpha$ -Ketoisovalerate metabolism in liver and interactions with other metabolic pathways. In: *Branched chain amino and keto acids in health and disease*; hrsg. v. Adibi SA, Fekl W, Langenbeck U, Schauder P. Karger Verlag, Basel: 41-80.
- WOLLEN N, BAILEY CJ (1988): Inhibition of hepatic gluconeogenesis by metformin. Synergism with insulin. *Biochem Pharmacol* 37: 4353-4358.
- WOLLHEIM CB (2000): Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in Type II diabetes. *Diabetologia* 43: 265-277.
- YAMADA M, ISOMOTO S, MATSUMOTO S, KONDO C, SHINDO T, HORIO Y, KURACHI Y (1997): Sulfonylurea receptor 2B and  $K_{IR}6.1$  form a sulfonylurea-sensitive but ATP-insensitive  $K^+$ channel. *J Physiol* 499: 715-720.
- YAMADA S, KOMATSU M, SATO Y, YAMAUCHI K, AIZAWA T, HASHIZUME K (2001): Glutamate is not a major conveyer of ATP-sensitive  $K^+$  channel-independent glucose action in pancreatic islet  $\beta$  cell. *Endocrine J* 48: 391-395.
- ZERANGUE N, SCHWAPPACH B, JAN YN, JAN LY (1999): A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane  $K_{ATP}$  channels. *Neuron* 22: 537-548.

## 8 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCH	2-Aminobicyclo[2.2.1]heptan-2-carbonsäure (Gemisch aus 10 % (±)-a-BCH und 90 % (±)-b-BCH)
BCKA-DH	Branched-chain keto acid-Dehydrogenase
Ber.	Berechnet
bidest.	bidestilliertes Wasser
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Ci	Radioaktivität in Curie (1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq)
COS	CV1, Origin of SV40
CPT1	Carnitin Palmitoyl Transferase 1
$\delta$	chemische Verschiebung [ppm]
d	Dublett (NMR)
DEAE	Diethylaminoethanol
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	Dulbecco modifiziertes Eagle Medium
DMSO(-d <sub>6</sub> )	(Hexadeutero-) Dimethylsulfoxid
dpm	disintegrations per minute
EC <sub>50</sub>	halbmaximal-wirksame Substanzkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
Gef.	Gefunden
GluDH	Glutamat-Dehydrogenase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
<sup>3</sup> H	Tritium (Isotop des Wasserstoff)
HbA1c	glykiertes Hämoglobin
HBSS	HEPES buffered saline solution
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
hrsg.	herausgegeben
IC <sub>50</sub>	halbmaximal-inhibitorische Substanzkonzentration
IR	Infrarot-Spektroskopie
IZ	intrazelluläre Lösung
J	Kopplungskonstante [Hz]
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal
KC	$\alpha$ -Ketocaprinsäure
KCO	K <sup>+</sup> -channel opener (Kaliumkanal-Öffner)
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
KIC	$\alpha$ -Ketoisocaprinsäure
K <sub>IR</sub>	einwärtsgerichteter Kaliumkanal
KIV	$\alpha$ -Ketoisovaleriansäure
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
KRHA	Krebs-Ringer-Hepes-Albumin-Puffer

M	mol/l
ME	Malat-Enzym
MG	relative Molmasse [g/mol]
min	Minute
mM	$10^{-3}$ mol/Liter
$\mu$ M	$10^{-6}$ mol/Liter
MMS	Monomethylsuccinat
MS	Massenspektroskopie
M/z	Masse pro Ladungseinheit
N	Anzahl der unabhängigen Einzelexperimente
n	Steigungskoeffizient (Hillkoeffizient)
NBF	nucleotide binding fold (Nukleotid-bindende Region)
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
NMRI	Naval medical research institute (USA)
P	Signifikanz
P1075	N-Cyano-N'-(1,1-dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidin
pA	$10^{-12}$ Ampere
p.a.	pro analysi
PBS	phosphate buffered saline solution
PC	Pyruvat-Carboxylase
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
pg	$10^{-12}$ g
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	$\beta$ -Phenylpyruvat
PP	Pankreatisches Polypeptid
ppm	parts per million
s	Singulett (NMR)
s	Sekunde
s. / s.o.	siehe / siehe oben
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
sext	Sextett (NMR)
sog.	so genannt
suppl.	Supplement
SUR	Sulfonylurea receptor (Sulfonylharnstoff-Rezeptor)
t	Triplett (NMR)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TMD	transmembrane domain
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Units
UDP	Uridin-5'-diphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
w/v	Massenanteil pro Volumen